Cytologische Untersuchungen an Tumoren mit unterschiedlichem klinischen Verhalten

H. R. NITZE

Universitäts-HNO-Klinik Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. med. K.-H. VOSTEEN)

Eingegangen am 1. Februar 1969

Cytological Investigation of Tumours with Different Clinical Progressivity

Summary. Five tumours removed from the larynx and the pharynx have been examined. The results of cytophotometric survey of the DNA content were compared with that of the cellkinetic and histological investigation as well as the clinical progress. A distinct correlation between the position of DNA-Stem-line in the aneuploid region and the development of the tumours was observed.

The cellkinetic and cytophotometric results showed that the irradiated cells remained in the G_2 -Phase for a long period.

Zusammenfassung. Die Ergebnisse der cytophotometrischen Untersuchung des DNS-Gehaltes von 5 Tumoren des Larynx und Pharynx, verglichen mit zellkinetischen Resultaten, histologischem Bild und klinischem Verlauf zeigten eine gewisse Korrelation zwischen Lage der DNS-Stammlinie im aneuploiden Bereich und Aggressivität des Tumors.

Als Reaktion des Tumorgewebes auf Strahlen kann ein längeres Verweilen der Tumorzellen in der G_2 -Phase nachgewiesen werden.

Einleitung

Die biologischen Charakteristica eines Tumors, seine Aggressivität, seine Wachstumsgeschwindigkeit und seine Radiosensibilität lassen sich aus dem histologischen Bild allein nicht beurteilen. Um diese Eigenschaften besser erkennen zu können, sind in den vergangenen Jahren eine ganze Reihe von Untersuchungsmethoden entwickelt worden, die bestimmte cytologische Merkmale festlegen sollen. Dabei handelt es sich einmal um Verfahren, die der Bestimmung der Ploidiestufe eines Tumors und zwar entweder durch quantitative Messung des DNS-Gehalts seiner Zellkerne oder direkt durch Chromosomenanalyse dienen. So kann man normale diploide von aneuploiden Zellen unterscheiden und auf diese Weise einen groben Anhalt für den Malignitätsgrad des Tumors gewinnen. Zum anderen kann man die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Gewebe durch autoradiographische oder durch die von BERTALANFFY (1964) ausgearbeitete Colchicinmethode abschätzen.

Mit diesem Verfahren sind in der experimentellen Tumorforschung schon viele Erfahrungen gesammelt worden. Auch aus dem klinischen Bereich liegen von anderen Fachgebieten, besonders aus der Gynäkologie (ATKIN, RICHARDS u. ROSS, 1959; BADER, TAYLOR, JR., u. ENGLE, 1960; SPRIGGS, BODDINGTON u. CLARKE, 1962; ATKIN, 1964; EICKE, EMMINGER, STRAUSS, MOHR u. WRBA, 1965; HUSSLEIN, 1967) und aus der Dermatologie (EHLERS, 1967) schon zahlreiche Mitteilungen vor. Systematische, zellkinetische und cytologische Untersuchungen an Tumoren aus dem HNO-Gebiet fehlen aber bisher. Dabei liegen hier die Verhältnisse besonders günstig: Die meisten Tumoren sind leicht und direkt zu erreichen und auch ihre Reaktion auf eine — vielleicht präoperative — Strahlenbehandlung läßt sich laufend kontrollieren.

In einer früheren Untersuchungsreihe hatten wir an experimentellen Tiertumoren (NITZE, ROSEMANN u. CHOU, 1968) die entsprechenden Untersuchungsverfahren schon auf ihre Stichhaltigkeit überprüft. Es sollen jetzt die ersten damit an menschlichem Tumorgewebe gewonnenen Resultate beschrieben werden.

Untersuchungsmaterial und Methode

Probeexcisionen des Tumors wurden fein zerschnitten. Der für die cytophotometrische Analyse vorgesehene Teil wurde auf Objektträger gequetscht, ausgestrichen, mindestens 1 Std luftgetrocknet und mit gepuffertem Formol fixiert. Frühestens 1 Woche vor der cytophotometrischen Analyse wurden die Präparate nach Feulgen gefärbt (Hydrolysezeit 10 min). Bis zur Messung blieben die gefärbten Präparate in einer schwarzen, lichtundurchlässigen Kammer.

Die quantitativen Messungen der DNS wurden mit dem Integrating Microdensitometer GN 2 nach DEELEY bei einer Wellenlänge von 570 m μ durchgeführt. Als Referenzzellen dienten die im gleichen Ausstrich liegenden Lympho- oder Leukocyten.

Für die autoradiographische Bestimmung der Verdopplungszeit wurden die Tumorexisate 1 Std in ^3H -Thymidin (spezifische Aktivität 3,9 C/mMol) bei 37° C inkubiert und dann Autoradiographien in typischer Weise mit dem Stripping Film Kodak AR 10 bei einer Belichtungszeit von 4 Wochen angefertigt. Auf 3000 Tumorzellen wurde die Zahl der markierten Zellen ausgezählt. Die Verdopplungszeit berechneten wir dann nach der von SCHULTZE u. OEHLERT (1960) angegebenen Formel $T_c = \frac{N_c \cdot T_s}{N_s}$. Für die Colchicinmethode inkubierten wir die Tumorexisate in vitro in einer Colcemidlösung (0,1 mg in 3 ml Hanks oder Eagles Medium). Vor und nach 3- und 4stündiger Inkubation wurden die Mitosen von 3000 Tumorzellen gezählt. Die Verdopplungszeit wurde aus den erhaltenen Mitoseindizes wie bereits beschrieben (NITZE, ROSEMANN u. CHOU, 1968) berechnet.

Befunde

Fall 1. F. K., weiblich, 54 Jahre. Seit 4 Jahren behinderte Nasenatmung links; in letzter Zeit Kopfschmerzen. *Befund.* Linke Nasenhaupthöhle und Epipharynx von einem Tumor mit himbeerartiger Oberfläche fast völlig verlegt. *Histologie:* Adamantinom, Therapie: Oberkieferenteilresektion links. Seit 14 Monaten rezidivfrei. Die

cytophotometrische Bestimmung des *DNS-Gehaltes* ergibt eine Stammlinie, die nur unwesentlich aus dem diploiden Bereich verschoben ist, bei minimaler Streuung des DNS-Gehalts der Zellkerne. Die *Verdopplungszeit* des Tumors, autoradiographisch gemessen, beträgt 440 Tage (Abb. 1).

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. DNS-Histogramm von Fall 1: *n* Zahl der Zellen, *A. E.* Arbeitseinheiten, *C* Ploidiegrad. ■ normale Blutzellen, □ Tumorzellen, T_c Verdopplungszeit, *d* Tage; (A) autoradiographisch gemessen

Abb. 2. DNS-Histogramm von Fall 2: Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3. DNS-Histogramm von Fall 3. Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 4. DNS-Histogramm von Fall 4. Zeichenerklärung s. Abb. 1

Fall 2. A. T., weiblich, 35 Jahre. Seit 5 Monaten langsam wachsender Tumor im rechten vorderen Gaumenbogen. *Histologie:* Mucoepidermoidcarcinom. Therapie: Exstirpation des Tumors. Seit 13 Monaten rezidivfrei. Cytophotometrische *DNS-Bestimmung:* Stammlinie im hyperdiploiden Bereich, geringfügige Streuung des DNS-Gehaltes (Abb. 2).

Fall 3. K. K., männlich, 68 Jahre. Seit 6 Wochen Heiserkeit. Exophytischer Tumor im hinteren Stimmbandtrittel links mit eingeschränkter Beweglichkeit. *Histologie:* Verhorntes Plattenepithelcarcinom. Therapie: Hemilaryngektomie, kein Befall der regionären Lymphknoten. Seit 14 Monaten rezidivfrei. Cytophotometrische *DNS-Bestimmung:* DNS-Stammlinie im tetraploiden Bereich mit geringer Streuung. Die *Verdopplungszeit* des Tumors, autoradiographisch bestimmt, betrug 8,1 Tage (Abb. 3).

Abb. 5. DNS-Histogramm von Fall 5: a) vor Bestrahlung; b) nach Bestrahlung. Zeichenerklärung s. Abb. 1; (C) = mit der Colchicintechnik gemessen. DNS-Bestimmung und T_c (C) wurden nach 1000 r, T_c (A) nach 3000 r gemessen

Fall 4. S. G., weibl. 75 Jahre. Seit 13 Monaten langsam zunehmende Verhärtung der Zunge rechts. *Histologie:* Verhornendes Plattenepithelcarcinom mit Infiltration der gesamten Zunge und des Mundbodens. Therapie: Bestrahlung mit 6000 r (schnelle Elektronen). Makroskopisch gute Reaktion des Tumors, seit 9 Monaten ohne Rezidiv. Cytophotometrische *DNS-Bestimmung:* hypertetraploide und hyperoctoploide Stammlinie, deutliche Streuung. Die *Verdopplungszeit* betrug autoradiographisch gemessen 5,0 Tage (Abb. 4).

Fall 5. O. F., männlich, 57 Jahre. Seit 3 Wochen Heiserkeit. Ausgedehnter Kehlkopfingangstumor, beide Stimmbänder nicht beweglich. *Histologie:* verhornendes Plattenepithelcarcinom. Therapie: Nach präoperativer Vorbestrahlung mit 3000 r Laryngektomie und Halslymphknotenrevision beiderseits. Anschließend Nachbestrahlung mit 3000 r. Beide Bestrahlungsserien wurden mit schnellen Elektronen durchgeführt. Seit 12 Monaten rezidivfrei. Cytophotometrische *DNS-Bestimmung:* Vor der Bestrahlung hyperdiploide, nachher tetraploide Stammlinie. Beide Male deutliche Streuung. Die *Verdopplungszeit* des unbestrahlten Tumors betrug autoradiographisch gemessen, 3,9 Tage, mit der Colchicinmethode bestimmt 6,5 Tage (Abb. 5a). Nach 1000 r sind die Stammlinien fast verschwunden und eine weite Streuung des DNS-Gehalts ist zu erkennen. Die Verdopplungszeit autoradiographisch gemessen beträgt 4,2 Tage, mit der Colchicinmethode bestimmt 140 Tage (Abb. 5b).

Diskussion

Die Malignität eines Tumors wird einerseits von den Eigenschaften der Geschwulst selbst (Wachstumsgeschwindigkeit, Zerstörungskraft, Metastasierungsneigung, Haftfähigkeit der einzelnen Tumorzelle) andererseits aber auch von den Gegebenheiten im Wirtsorganismus (allgemeine Reaktionslage, Art des dem Tumor benachbarten Gewebes) bestimmt. Es ist deshalb von vornherein problematisch, den klinischen Malignitätsgrad einer Tumorerkrankung allein aus Parametern zu bestimmen, die lediglich den Tumor selbst berücksichtigen. Unter diesem prinzipiellen Vorbehalt ist auch der Versuch zu sehen, aus der Ploidiestufe auf den Malignitätsgrad von Tumoren zu schließen.

Die Ploidiestufe ist ein objektives Zeichen dafür, in welchem Grade sich der DNS-Gehalt eines Tumors von dem des normalen Gewebes unterscheidet. Der bei Geschwülsten meist erhöhte DNS-Gehalt ist aber nicht, wie man zuerst annahm, ein direktes Zeichen der Malignität, sondern lediglich der Ausdruck dafür, daß, wahrscheinlich durch überstürzte Zellvermehrung, Störungen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Chromosomen aufgetreten sind. Dafür spricht auch, daß Abweichungen vom diploiden Satz, wenn auch in geringerem Ausmaße, bei Präkanzerosen, gutartigen Tumoren und schnell wachsendem Gewebe (regenerierende Leber) gefunden werden (LEUCHTENBERGER u. LEUCHTENBERGER, 1966).

Der veränderte DNS-Gehalt läßt sich am Wandern der Stammlinie aus dem euploiden Bereich erkennen. Die Stammlinie ist offenbar für jeden Tumor individuell verschieden, meist relativ konstant (RUTISHAUSER, 1963) und somit das Kennzeichen der den Tumor charakterisierenden Zellpopulation. Bis zur Stabilität der Stammlinie durchläuft ein Tumor aber wahrscheinlich eine Periode des genetischen Ungleichgewichts (EICKE, EMMINGER, STRAUSS, MOHR u. WEBER, 1965) mit einem hohen Prozentsatz polyploider Zellen. Leider ist, zumindest aus der einmaligen DNS-Analyse, kaum zu erkennen, ob der Tumor schon eine stabile Stammlinie ausgebildet hat.

Weil aber nur eine tumorcharakteristische Stammlinie zu bestimmten klinischen Eigenschaften in Beziehung gesetzt werden kann, sind einmalige Untersuchungen nur mit Einschränkung zu bewerten. So können auch die Unterschiede in den Befunden einzelner Untersucher erklärt werden. Teilweise wurde nämlich ein Zusammenhang zwischen klinischen Eigenschaften einer Geschwulst und der Lage ihrer Stammlinie im aneuploiden Bereich abgelehnt (ISING u. LEVAN, 1957; BADER, TAYLOR, JR., u. ENGLE, 1960; TILL, 1961; SPRIGGS, BODDINGTON u. CLARKE, 1962; ISHIHARA, KIKUCHI u. SANDBERG, 1963; EICKE, EMMINGER, STRAUSS, MOHR u. WRBA, 1965) teilweise eine solche Beziehung bestätigt (ATKIN, RICHARDS u. ROSS, 1959; ATKIN, 1964; EHLERS, 1967).

Abb. 6. Zellcyclus. *M* Mitosephase; *G₁* präsynthetische Phase, *G₂* postsynthetische Phase; *S* Synthesephase

Bei unseren Untersuchungen hatten die klinisch benignen Tumoren eine Stammlinie im diploiden bzw. hyperdiploiden Bereich und streuten nur gering (Fall 1 und 2); die Stammlinien der malignen Tumoren lagen dagegen im tri- bis tetraploiden Bereich und streuten sehr (Fall 3–5). Offenbar befanden sich die untersuchten Tumoren bereits in einem Stadium, in dem sie ihre spezifische Stammlinie ausgebildet hatten.

Eine weite Streuung des DNS-Gehaltes zwischen Stammlinie und deren doppeltem Wert weist vor allem auf ein schnelles Wachstum hin: Während der ersten Phasen eines Zellcyclus (Abb. 6) ist der DNS-Gehalt der Zelle konstant. Erst während der *S*-Phase steigt er kontinuierlich bis zum doppelten Wert an, bleibt während der *G₂*-Phase in gleicher Höhe und wird dann während der Mitose wieder auf den einfachen Ausgangswert reduziert. Je schneller Gewebe proliferiert, um so mehr Zellen sind in der *S*- und *G₂*-Phase und können an ihrem erhöhten DNS-Gehalt erkannt werden. Selbstverständlich können auch echte Streuungen auftreten; diese sind aber nicht von den zellkinetisch bedingten zu unterscheiden, so daß eine Streuung im obengenannten Bereich meist auf eine kurze Cycluszeit hinweist.

Die Verdopplungszeit läßt sich, genauer als mit diesem lediglich grob orientierenden Verfahren, auf autoradiographischem Wege über den ^3H -Markierungsindex und mit der Colchicinmethode über den Mitoseindex bestimmen. Allerdings geben auch diese beiden Methoden keine absoluten Werte wieder. Denn beide gehen von der wahrscheinlich unzutreffenden Voraussetzung aus, daß die *S*-Phase konstant ist, daß kein Zellverlust vorkommt und daß sich alle Tumorzellen am Wachstum beteiligen. Die Befunde sind aber dennoch untereinander gut vergleichbar.

Natürlich ist rasche Wachstumsgeschwindigkeit nicht mit Malignität gleichzusetzen. Bei normaler Darmschleimhaut beispielsweise liegt die Einbaurate von ^3H -Thymidin und damit auch die Proliferationsgeschwindigkeit sehr viel höher als bei bösartigen Geschwülsten. Aber solche schnellwachsenden Normalgewebe verfügen durch gleichzeitiges Abstoßen von abgestorbenen Zellen über ein steady state, das den Tumoren verlorengegangen ist. Zur Ergänzung der histologischen und cytophotometrischen Resultate ist die Bestimmung der Cycluszeit allerdings sehr wertvoll.

Bei den von uns untersuchten Tumoren ergaben sich extrem lange Verdopplungszeiten bei den benignen und kurze Verdopplungszeiten bei den malignen Tumoren.

Damit stimmten die klinischen und histologischen Kriterien einerseits mit den cytophotometrischen und zellkinetischen Ergebnissen andererseits überein.

Auch die Reaktion von Geschwulstgewebe auf eine Strahlentherapie läßt sich mit der Cytophotometrie und der Verdopplungszeitbestimmung beurteilen (Abb. 5a und b): In den DNS-Histogrammen findet man einen Verlust der Stammlinie bei weit ausgedehnter Streuung des DNS-Gehaltes einzelner Tumorzellkerne bereits nach 1000 r. Diese auch von HUSSLEIN (1967) beschriebene Beobachtung hängt offenbar damit zusammen, daß sich bei Bestrahlung der Durchtritt der Zellen durch die späte *S*-Phase und die G_2 -Phase verlangsamt (POST u. HOFFMANN, 1965; LAMERTON, 1966). Darüber hinaus können die Zellen teilweise sogar längere Zeit in der G_2 -Phase verweilen (KELLY, 1958; TILL, 1961). Die Cycluszeitbestimmungen ergeben dementsprechend nach Bestrahlung unterschiedliche Werte: Da mit der autoradiographischen Methode die Verdopplungszeit in der *S*-Phase gemessen wird, bleibt sie von der Bestrahlung unbeeinflusst, und ihre Verlangsamung wird erst dann erfaßt, wenn durch die Colcemidmethode auch die Mitosephase zum Vergleich herangezogen wird; sie steigt dann auf etwa das Zehnfache des Ausgangswertes an. Bei unseren vorausgegangenen tierexperimentellen Untersuchungen erhielten wir ähnliche Ergebnisse (NITZE, ROSEMAN)

u. CHOU, 1968). Möglicherweise können diese Kriterien ein objektives Maß für die Ansprechbarkeit von Tumorgewebe auf Strahlen darstellen.

Die cytogetenetische und zellkinetische Analyse maligner Tumoren kann zusätzlich zu den Ergebnissen histomorphologischer Untersuchungen bedeutsame Informationen liefern. Ausgedehnte und systematische Untersuchungen müssen zeigen, ob sich tatsächlich prognostische oder therapeutische Konsequenzen daraus ergeben können.

Herrn Prof. SANDRITTER, Direktor des Pathologischen Institut der Justus Liebig-Universität Gießen, jetzt Freiburg, und seinen Mitarbeitern Herrn Doz. rer. nat. KIEFER und Herrn SCHLÜTER danken wir sehr für die lebenswürdige Unterstützung dieser Untersuchungen, die wir zum Teil in ihrem Institut durchführen durften.

Literatur

- ATKIN, N. B.: The chromosomal changes in malignancy; an assessment of their possible prognostic significance. *Brit. J. Radiol.* **37**, 213—218 (1964).
- B. M. RICHARDS, and A. J. ROSS: The deoxyribonucleic acid content of carcinoma of the uterus: An assessment of its possible significance in relation to histopathology and clinical course based on data from 165 cases. *Brit. J. Cancer* **13**, 773—787 (1959).
- BADER, S., H. C. TAYLOR, JR., and E. T. ENGLE: Desoxyribonucleic acid (DNA) content of human ovarian tumors in relation to histological grading. *Lab. Invest.* **9**, 443—459 (1960).
- BERTALANFFY, F. D.: Tritiated thymidine versus colchicine technique in the study of cell population cytodynamics. *Lab. Invest.* **13**, 871—886 (1964).
- EHLERS, G.: Zytophotometrische Untersuchungen an Basalzellepitheliomen. *Krebsforschung und Krebsbekämpfung*, Bd. VI, S. 121—128. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1967.
- EICKE, J., A. EMMINGER, CH. STRAUSS, U. MOHR u. H. WRBA: Cytogetenetisch-karyologische Studien an klinisch behandelten gynäkologischen Tumoren. *Z. Krebsforsch.* **67**, 205—212 (1965).
- HUSSLEIN, H.: Cytogetenetische und cytochemische Untersuchungen bei malignen Tumoren. *Klin. Wschr.* **45**, 746 (1967).
- ISHIHARA, T., Y. KIKUCHI, and A. A. SANDBERG: Chromosomes of twenty cancer effusions: Correlation of karyotypic, clinical and pathologic aspects. *J. nat. Cancer Inst.* **30**, 1303—1361 (1963).
- ISING, U., and A. LEVAN: The chromosomes of two highly malignant human tumors. *Acta path. microbiol. scand.* **40**, 13—24 (1957).
- KELLY, L. S.: DNA-Synthesis in irradiated animals. II. *Un. Int. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy. Bericht 15/P/886* (1958).
- LAMERTON, L. F.: Cell proliferation under continuous irradiation. *Radiat. Res.* **27**, 119—138 (1966).
- LEE, B. T. O., and B. W. HOLLOWAY: The genetic control of radiosensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Radiat. Res.* **25**, 68—77 (1965).
- LEUCHTENBERGER, C., and R. LEUCHTENBERGER: DNA in tumors and virus infections. In: *Handbuch der Histochemie, III. Nucleinsäuren*, S. 1—53. Stuttgart: G. Fischer 1966.
- NITZE, H. R., G. ROSEMAN u. J. T.-Y. CHOU: Malignitätskriterien und ihre Beeinflussbarkeit am Modell eines chemisch induzierten Gehörgangscarcinoms der Ratte. *Arch. klin. exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk.-Heilk.* **192**, 214—228 (1968).

- POST, J., and J. HOFFMANN: Dose-dependent effects of H^3 -TDR as a DNA label on the replication of liver cells in the growing rat. *Radiat. Res.* **26**, 422—441 (1965).
- RUTISHAUSER, A.: Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren. *Neujahrsblatt der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, S. 1—85 (1963).
- SCHULTZE, B., u. W. OEHLERT: Autoradiographic investigations of incorporation of ^3H -Thymidine into cells of the rat and mouse. *Science* **131**, 737 (1960).
- SPRIGGS, A. I., M. M. BODDINGTON, and C. M. CLARKE: Chromosomes of human cancer cells. *Brit. med. J.* **1962 II**, 1431—1435.
- TILL, J. E.: Radiation effects on the division cycle of mammalian cells in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **95**, 911—919 (1961).

Dr. H. R. NITZE
Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik
6000 Frankfurt a. M.,
Ludwig Rehn-Str. 14