

Cell proliferation and tumour growth of lung cancer : a clinical, immunohistochemical and flow cytometric study

Citation for published version (APA):

ten Velde, G. P. M. (1989). Cell proliferation and tumour growth of lung cancer : a clinical, immunohistochemical and flow cytometric study. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1989

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

■ Summary

Lung cancer is the most frequent malignant tumour in men and its incidence is rising in women. In the USA the number of female lung cancer deaths is already higher than the number of breast cancer deaths. In recent years, the incidence of lung cancer in age groups below 65 years in Western World appears to decrease due to the reduction of cigarette smoking. However, the prognosis of lung cancer has not significantly improved during the last 30 years: 90% of the patients will die within one year due to the disease.

The majority of the patients (75%) falls into the category of non-small cell lung cancer (NSCLC) which comprises several histological subgroups which, however, do not differ in treatment. The treatment of NSCLC is preferentially surgical with a 5-year survival of 25%. Radiotherapy and chemotherapy have a mainly palliative value for non-operable patients.

A minority (25%) of the patients has small cell lung carcinoma which will be treated preferentially with chemotherapy and has a median survival of 16 months for the best group.

It has been known for a long time that the prognosis of lung cancer can be predicted on the basis of several prognostic factors including performance status, histological type and stage of the tumour. However, the prognostic power of these factors is far from complete and their value is limited in the case of an individual patient. It is clear that other factors are also important in determining the survival of lung cancer patients, as for example the tendency of the tumour to metastasize, the growth rate of the tumour and the sensitivity of the tumour to radio- or chemotherapy. It is generally accepted that genetic alterations in tumour cells are responsible for these factors and more generally determine features of growth and determination of the tumour.

In this thesis some properties of lung cancer tumour cells related to tumour growth and metastasis have been studied in order to establish whether or not these properties might be correlated with the behaviour of the tumour in the individual patient. The invasive behaviour of lung cancer was studied with regard to the basement membrane (BM) which separates tumour cells from tumour stroma, and constitutes the first barrier for invasively growing neoplastic cells. Furthermore, the proliferative cell compartment of lung cancers was investigated, using either the flow cytometric (FCM) determination of the number of tumour cells which are in S-phase (the so-called S-phase fraction or SPF), or by measurement of DNA synthesizing properties through incorpora-

tion of the thymidine analogue bromodeoxyuridine (BrdU) in DNA synthesizing (S-phase) cells. In addition changes in the ploidy level in individual tumour cells were studied, as a reflection of the genetic abnormalities in cancer cells. Finally, the extent of metastasis in bone marrow was studied in small cell lung cancer, as a potential prognostic indicator.

In **chapter 1** current knowledge regarding to BM deposition, ploidy levels and cytokinetics, as it relates to lung cancer, is reviewed.

In **chapter 2** we describe the pattern of invasive growth in primary adenocarcinomas of the lung as reflected in the pattern of BM staining. Generally, adenocarcinoma appeared to display the same expansive and invasive growth pattern as squamous cell lung cancer. Expansive growth occurred in the periphery of the tumour; here tumour cells grew along pre-existing BM of the alveoli, undermining the pneumocytes. Invasion into the interstitium was found in the center of the tumour. Here the pattern and extent of the BM depositions varied widely. Occasionally, a pattern resembling alveolar BM was found in the center of the tumour. Part of this alveolar-like architecture could be pre-existing BM. It is, however, impossible to distinguish between pre-existing alveolar BM and de novo synthesized BM. In contrast with squamous cell lung cancer, in some peripheral sections of adenocarcinoma tumour cells were found between the alveolar and interstitial BM, suggesting invasive growth also in the tumour periphery. This could explain why adenocarcinomas of the lung metastasize earlier than squamous cell lung cancers.

In **chapter 3** we studied whether or not the quantity of BM deposited between squamous lung cancer cell and the interstitium correlated with survival time. A Cox regression analysis, including BM deposition and stage of the tumour, suggested that extensive BM deposition could be an independent prognostic factor for survival, although the difference was not statistically significant.

In **chapter 4** we analysed the importance of bone marrow biopsy for the staging of small cell lung cancer. Firstly, we studied whether or not a panel of eight antibodies would detect more bone marrow metastases than the routinely applied haematoxylin eosin staining. In a series of histologically identified metastases two antibodies (against neuron specific enolase and cytokeratins 8, 18 and 19) stained all specimens with bone marrow metastases. In 47 histologically tumour negative biopsies these two antibodies were used. However, in none of the histologically negative biopsies immunoreactive tumour cells were detected. This finding contrasted with data from the literature: in fresh aspirates of bone marrow metastases have been found more frequently in cytological preparations, with the use of several antibodies. This difference might be caused

by aspiration of blood along with the bone marrow, which contains circulating tumour cells, which have not (yet) formed metastases. We furthermore established that the results of the bone marrow biopsies in small cell lung cancer did not have prognostic or therapeutic implications.

In **chapter 5** we describe the results of the prognostic value of the ploidy level and the proportion of cells in S-phase in non-small cell lung carcinoma. More than 50% of the 115 examined paraffin embedded tissue samples were suitable for DNA-FCM. In 65% of these cases aneuploidy was found. A multivariate analysis, including stage of tumour, age, histology and treatment modality showed that the DNA index was not related with histology, stage or treatment modality. Also no influence on survival was found. SPF was not dependent on tumour stage, histology or treatment modality but a significantly longer survival was found for patients with a low SPF.

To gain a more detailed insight into the proliferative activity of lung cancers than can be reached with the static measurement of SPF, the feasibility to determine the BrdU incorporation for the labeling of DNA synthesizing lung cancer cells was investigated. In **chapter 6** a method is described for the *ex vivo* labeling of tumour cells obtained by bronchoscopic brush. After short culturing in a BrdU containing medium these tumour cells were stained with anti-BrdU antibody and propidium iodide. This method was found to yield reproducible results, in that in the majority of cases labeled cells could be detected. The labeling index correlated significantly with the SPF. Also it was shown that a proportion of cells with S-phase DNA content did not actively synthesize DNA. In follow-up, an *in vivo* BrdU labeling study of lung cancer patients was performed: 50 mg/m² BrdU was given intravenously to patients over 10 minutes, 4 hours before bronchoscopy. In **chapter 7** we report that it is possible to obtain cancer cell labeling in the majority of patients using biopsies as well as brushes. Again, unlabeled cells with S-phase DNA content were observed; their frequency, however was lower than with the *ex vivo* method.

In the **final chapter** the heterogeneity of lung cancer is reemphasised. Furthermore, the results of our investigations are discussed in the perspective of tumour cell invasion, tumour metastasis, tumour cell proliferation and genetic tumour cell abnormalities as expressed in the ploidy level. Finally some speculations are made concerning the potential use of cytokinetic parameters for treatment and prognostication of lung cancer patients.

■ Samenvatting

Longkanker is het meest voorkomende kwaadaardig gezwel bij de man en komt steeds frekwenter voor bij de vrouw. In de Verenigde Staten is het aantal vrouwen dat aan longkanker overlijdt al groter dan door borstkanker het geval is. In de laatste jaren is er een dalende tendens waarneembaar van het aantal longkankerpatiënten beneden de 65 jaar in de Westerse Wereld, waarschijnlijk grotendeels ten gevolge van het feit dat er minder sigaretten worden gerookt. De prognose van patiënten met longkanker is echter niet of nauwelijks verbeterd gedurende de laatste 30 jaar; van degenen die longkanker krijgen overlijdt ongeveer 90% ten gevolge van deze ziekte binnen een jaar.

Het grootste deel (75%) van de patiënten heeft een niet-kleincellig longcarcinoom, dat verschillende histologische subtypen omvat, die echter op dezelfde manier behandeld worden. De behandeling van het niet-kleincellig longcarcinoom is bij voorkeur chirurgisch, met een 5-jaars overleving van 25%. Radiotherapie en chemotherapie hebben voor de niet-operabele patiënten voornamelijk palliatieve betekenis.

Een minderheid (25%) van de longkankerpatiënten heeft een kleincellig longcarcinoom, dat bij voorkeur chemotherapeutisch wordt behandeld; de mediane overleving voor de beste groep is 16 maanden.

Al lang is bekend dat de prognose van longkanker aan de hand van een aantal factoren wordt voorspeld zoals de "performance status", het histologische type van longkanker en het stadium waarin de tumor verkeert. Deze prognostische kenmerken hebben echter maar een beperkte voorspellende waarde voor de individuele patiënt en zijn zeker niet volledig.

Het is duidelijk dat hiernaast nog een aantal factoren de overleving van longkankerpatiënten bepalen, zoals b.v. de neiging van de tumor tot metastasering, de groeisnelheid en de gevoeligheid voor chemo- of radiotherapie. In het algemeen wordt aangenomen dat genetische veranderingen in individuele kancercellen voor deze factoren verantwoordelijk zijn en meer in het algemeen de groei en differentiatie van tumoren bepalen.

In dit proefschrift zijn enkele eigenschappen van longkanker tumorcellen bestudeerd die verbonden zijn met tumor groei en metastasering, met het doel vast te stellen of deze kenmerken het gedrag van de tumor in de individuele patiënt kunnen voorspellen. Het invasieve gedrag van longkanker werd bestudeerd aan de hand van de basaalmembraan (BM), die tumorcellen van tumor stroma scheidt en de eerste barriere is voor invasief groeiende tumorcellen.

Daarnaast werd het proliferatieve karakter van longkanker onderzocht, middels flow cytometrische (FCM) bepaling van het aantal tumorcellen dat in S-fase verkeert (de zgn. S-fase fractie = SPF) alsook door het meten van de DNA synthetiserende eigenschappen door middel van de bromodeoxyuridine (BrdU) incorporatie (een thymidine analoog) in DNA synthetiserende (S-fase) cellen. Tevens werden veranderingen in het ploïdie niveau in individuele tumorcellen bestudeerd, als een weerspiegeling van de genetische veranderingen in tumorcellen. Tenslotte werd de omvang van beenmergmetastasen bij kleincellig longcarcinoom bestudeerd als een mogelijke prognostische aanwijzing.

In **hoofdstuk 1** wordt de huidige kennis van BM depositie, ploïdie niveaus en cytokinetiek besproken, voor zover deze met longkanker in verband staan.

In **hoofdstuk 2** beschrijven wij het patroon van invasieve groei van primair adenocarcinoom van de longen zoals zich dat voordoet in het patroon van BM aankleuring. In grote lijnen werd bij het adenocarcinoom hetzelfde expansieve en invasieve patroon gevonden als bij de plaveiselcelcarcinomen. Expansieve groei vindt plaats in de periferie van de tumor, waar tumorcellen langs de bestaande BM van de alveoli groeien, onder de pneumocyten of deze wegduwend. Invasie in het interstitium werd in het centrum van de tumor gevonden, waar een grote variëteit in het patroon en de uitbreiding van BM depositie werd gevonden. Af en toe werd in het centrum van de tumor een patroon gevonden dat erg veel leek op alveolair BM. Een deel van deze min of meer alveolaire architectuur zou pre-existent BM kunnen zijn. Het is echter onmogelijk een onderscheid te maken tussen het pre-existente BM en het nieuw gesynthetiseerde BM. In tegenstelling tot de bevindingen bij het plaveiselcelcarcinoom van de long werden in sommige preparaten in de periferie van het adenocarcinoom tumorcellen gevonden tussen het alveolaire en interstitiële BM. Dit suggereert dat er in de periferie van de tumor ook invasieve groei optreedt. Dit zou kunnen verklaren waarom adenocarcinomen van de long eerder metastaseren dan plaveiselcelcarcinomen.

In **hoofdstuk 3** bestudeerden we of de hoeveelheid BM depositie tussen tumorcellen van plaveiselcelcarcinomen van de long en het interstitium gecorreleerd was met de duur van de overleving. Een Cox regressie analyse inclusief BM depositie en stadium van de tumor suggereerde dat de depositie van veel BM een onafhankelijke prognostische faktor voor overleving zou kunnen zijn, hoewel het verschil niet statistisch significant was.

In **hoofdstuk 4** onderzochten wij het belang van een beenmergbiopsie in de staging van het kleincellig longcarcinoom. Allereerst bestudeerden we of een panel van acht antilichamen meer beenmergmetastasen kon aantonen in patiënten met kleincellig longcarcinoom dan routine hematoxyline/eosine kleuring. In een serie van histologisch aangetoonde metastasen kleurden 2 antilichamen (neuron-

specifiek enolase en cytokeratine 8, 18 en 19) alle preparaten met beenmergmestastasen aan. In 47 histologisch negatieve biopten werden deze twee antilichamen gebruikt. Echter in géén van de histologisch negatieve biopten werden immuunreactieve tumorcellen gevonden. Deze bevinding is in tegenstelling tot gegevens uit de literatuur: in verse beenmergaspiraten werden frekwenter beenmergmestastasen vastgesteld, wanneer verschillende antilichamen werden gebruikt. Dit verschil zou veroorzaakt kunnen worden door aspiratie van bloed tesamen met beenmerg, waarin circulerende tumorcellen aanwezig zijn, die (nog) geen manifeste metastasen hebben gevormd.

Wij stelden tevens vast dat de resultaten van een beenmergbiopsie bij klein-cellig longcarcinoom géén prognostische of therapeutische implicaties heeft.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we de resultaten van een onderzoek naar de prognostische waarde van bepaling van het ploïdie niveau en het aantal cellen die in S-fase verkeren bij niet-kleincellige bronchuscarcinomen. Ruim de helft van 115 in paraffine bewaarde tumoren was geschikt voor DNA-FCM. In 65% van de gevallen werd aneuploidie gevonden. Een multiparameter analyse, die tumor stadium, leeftijd, histologie en wijze van behandelen bevatte, toonde aan dat de DNA index niet gerelateerd was aan histologie, stadium en vorm van behandeling, en ook niet met de overlevingsduur. Ook de fractie van de cellen, die in S-fase verkeerde was niet afhankelijk van tumorstadium, histologie of vorm van behandeling. Voor patiënten met een laag aantal cellen in S-fase werd een significant langere overleving gevonden.

Om een betere indruk van de proliferatie activiteit van longcarcinomen te verkrijgen werd de bruikbaarheid van BrdU inkorporatie voor het bepalen van de proliferatie van longkankercellen onderzocht. In **hoofdstuk 6** wordt een methode beschreven, waarbij tumorcellen, verkregen met een borstel tijdens een bronchoskopie, kortdurend in een BrdU bevattend medium worden geïncubeerd en vervolgens gekleurd met een anti-BrdU antilichaam en propidium iodide. Deze methode bleek bruikbaar, want in de meerderheid van de gevallen werden gelabelde cellen aangetoond. De labeling index correleerde significant met het aantal cellen in S-fase. Tevens werd aangetoond dat er in de fractie cellen met S-fase DNA gehalte een populatie cellen aanwezig is die niet actief aan de DNA synthese deel neemt.

Vervolgens werd een in vivo BrdU labeling studie van longkanker patiënten uitgevoerd: 50 mg/m² BrdU werd 4 uur vóór de bronchoskopie gedurende 10 minuten intraveneus aan de patiënten toegediend. In **hoofdstuk 7** beschrijven we dat het in de meerderheid van de patienten mogelijk is met borstel en biopsie

DNA synthetiserende cellen aan te tonen. Ook nu werden niet synthetiserende S-fase cellen aangetoond, echter duidelijk minder dan met de ex vivo methode het geval was.

In het **laatste hoofdstuk** wordt de heterogeniteit van longkanker nog eens benadrukt. Tevens worden de resultaten van het onderzoek bediscussieerd in het perspectief van de invasie van tumorcellen, metastasering van tumor, proliferatie van tumorcellen en genetische afwijkingen van tumorcellen zoals die uitgedrukt worden in het ploïdie niveau. Uiteindelijk wordt gespekuleerd over de potentiële waarde van cytokinetische parameters voor de behandeling en prognose stelling van patiënten met longkanker.