

# Cancer cell ploidy and proliferation in colorectal carcinoma

## Citation for published version (APA):

Schutte, B. (1987). Cancer cell ploidy and proliferation in colorectal carcinoma. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

## Document status and date:

Published: 01/01/1987

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

This thesis describes a flow cytometric study on ploidy and proliferative activity in colorectal carcinoma. The aim of the study was to evaluate ploidy and proliferative activity, as reflected by the percentage of DNA synthesizing cells, as pretreatment prognostic parameters.

Until recently, flow cytometry was restricted to the use of fresh tumor tissue. In chapter 2 the feasibility of using paraffin-embedded tumor tissue for determination of cellular DNA content was investigated. The DNA derived fluorescence intensity in this material was always decreased and showed a much higher intersample variability compared to that obtained with fresh material. Using chicken red blood cells as a model system, we found that the lower fluorescence intensity is caused by the formalin fixation step. The intersample variability was found to be at least partly caused by variations in the duration of fixation, which for routine pathology samples is not standardized. For standardization, nuclei from paraffin-embedded normal and tumor tissue and processed simultaneously were mixed. With this method DNA indices of 24 colorectal cancers were found to be closely correlated with DI obtained from fresh tumor tissue samples from the same patients. The correlation of the percentages of S-phase nuclei between paraffin-extracted and fresh samples was as high as could be expected, taking sampling differences into account. In chapter 3 the retrospectively measured ploidy and percentage of S-phase cells and the relation of these parameters with clinicopathological parameters was investigated in 279 colorectal carcinomas. There was no correlation between DNA index or percentage S-phase cells and stage, grade, age, plasma CEA level or immunoreactivity for secretory component, serotonin and Ca 19-9. However, expression of CEA and absence of mucin production were associated with aneuploidy. In addition, tumors in the left hemicolon, ulcerative tumors and tumors which presented with anal blood loss, were more frequently aneuploid.

Chapter 4 reports on the comparison of phenotypic and genotypic characteristics between 87 primary large bowel carcinomas and their lymph node metastases. Primary tumors and their metastases were quite comparable in their phenotypic features. In the few discrepant cases, metastases did not invariably show a more restricted pattern than primary tumors, suggesting high differentiability plasticity of colorectal cancer cells. In the majority of cases no differences in DNA index were found. However, in a limited number of cases, genotypic discrepancies were

observed, indicative of selection in metastases.

Chapter 5 describes a study of the prognostic significance of ploidy levels and proliferative activity in 279 cases of large bowel carcinomas. A borderline significant association between ploidy and survival was found, with a 75th quantile survival of 49.8 months for patients with diploid tumors and 35.9 months for patients with aneuploid tumors. After stratification for staging, only Dukes' C cases showed a statistically significant association between tumor ploidy and survival. Survival analysis for proliferative activity and disease-related death showed a similar outcome with the strongest association in Dukes' C stage of disease (75th quantile survival of 38.9 months for low proliferative and 18.0 months for high proliferative tumors).

In chapter 6 the limitations of DNA flow cytometry are discussed and the rationale for dynamic cytokinetic studies using BrdU incorporation is presented. It might be obvious that a static measurement such as the determination of S-phase cells can not describe a dynamic process such as cellular growth accurately. Chapter 7 describes a new flow cytometric staining protocol for the immunocytochemical detection of BrdU labeled nuclei. Pepsin treatment of ethanol fixed cells or tissue followed by DNA denaturation at low pH resulted in increased sensitivity, comparable to the thermal denaturation protocol. The technique is applicable to cell suspensions, including cultured cells and bone marrow cells. Furthermore, pepsin digestion of ethanol fixed tissue fragments resulted in a high recovery of nuclei in which incorporated BrdU could be detected. This possibility, together with the high sensitivity, makes this method especially suitable for cell kinetic studies of human solid tumors.

In chapter 8 pepsin digestion of tissue sections was tested for its ability to increase anti-BrdU immunoreactivity. It was found that pepsin digestion prior to acid denaturation of cellular DNA, could increase anti-BrdU immunoreactivity in a fixative dependent way. With crosslinking agents such as formalin and glutaraldehyde high pepsin concentrations could be used before seriously affecting morphology.

Chapter 9 describes a rapid and convenient immunocytochemical method for the simultaneous detection of antigen expression and S-phase cells by means of anti-BrdU antibodies. For the dual peroxidase staining technique the DAB color modification by cobalt ions was used. It was shown that antigen localization was not affected by the BrdU staining protocol. The technique can

be performed on frozen or paraffin-embedded tissue and cyto-centrifuge preparations and allows cytokinetic studies of phenotypically defined cells in heterogeneous populations.

In chapter 10 a detailed cytokinetic study was made on 13 colorectal cancer cell lines using BrdU incorporation with subsequent immunocytochemical detection. It was found that there were no systematic differences in labeling indices, potential doubling times and growth fractions between diploid and aneuploid cell lines either grown in vitro or as xenografts in nude mice. When grouped according to grade, moderately differentiated xenografts showed longer volume doubling times than poorly differentiated xenografts, whereas again no differences were measured in the potential doubling time. It is concluded that cell loss is an important determinant of the tumor growth rate. It is postulated that terminal differentiation, leading to a programmed cell death, is most likely responsible for the observed differences.

Chapter 11 contains a general discussion and highlights the biological and clinical relevance of dynamic cell kinetic measurements.

In het eerste deel van dit proefschrift wordt een flow cytometrische studie beschreven van de ploïdie graad en proliferatieve activiteit van tumoren van de dikke darm. Het doel van de studie was om na te gaan of de ploïdie graad en de proliferatieve activiteit, in dit geval het percentage DNA synthetiserende cellen, de prognose van de patient kunnen voorspellen. Tot voor kort, kon voor flowcytometrische bepalingen alleen vers tumor materiaal gebruikt worden. In hoofdstuk 2 is onderzocht of paraffine ingebed materiaal geschikt is voor de bepaling van het DNA gehalte van een cel. De intensiteit van de DNA fluorescentie in dit materiaal bleek altijd geringer en vertoonde een grote variatie tussen de verschillende monsters in vergelijking met metingen uitgevoerd op vers materiaal. Met rode bloed cellen van de kip als model systeem werd aangetoond dat de verlaagde fluorescentie intensiteit te wijten was aan de formiline fixatie stap. De onderlinge variatie kon worden toegeschreven aan de variaties in de duur van fixatie, die in de routine pathologie niet gestandaardiseerd is. Voor de standardizatie van DNA histogrammen werden derhalve kernen van normaal en tumor weefsel gebruikt, dat gelijktijdig was. Op deze wijze werd de ploïdie graad (DNA index) van 24 dikke darm tumoren bepaald. De DNA indices van paraffine ingebed materiaal correleerden in sterke mate met DNA indices van dezelfde tumoren, wanneer deze vers opgewerkt werden. De percentages S-fase cellen, gemeten op beide manieren, vertoonden een geringere correlatie. Dit kan verwacht worden wanneer men bedenkt dat deze bepaling sterk afhankelijk is van waar het monster genomen is.

In hoofdstuk 3 werden de ploïdie graad en het percentage cellen in de S-fase van de celcyclus retrospectief gemeten in 279 dikke darm tumoren en vergeleken met klinische en pathologisch gegevens. Er werden geen correlaties gevonden tussen de ploïdie graad of het percentage S-fase cellen en de uitbreiding van de tumor, differentiatie graad, leeftijd, plasma CEA spiegels of immunoreactiviteit tegen SC, serotonine en Ca 19-9. Echter, de expressie van CEA en de afwezigheid van slijm productie werden vaker gevonden by aneuploïde tumoren. Ook de linkszijdige en ulceratieve tumoren, alsmede de tumoren, die zich presenteerden met anaal bloed verlies, waren vaker aneuploïd.

Hoofdstuk 4 beschrijft de vergelijking van de fenotypische en genotypische kenmerken tussen 87 primaire dikke darm tumoren en uitzaaiingen daarvan in de lymfeklieren. Primaire tumoren en

uitzaaiingen in de lymfeklieren waren vergelijkbaar wat betreft hun fenotypische kenmerken. In enkele gevallen week de ploïdie graad van de primaire tumor af van de ploïdie graad in de uitzaaiingen. Dit wijst er op dat uitzaaiing een selectief proces kan zijn.

Hoofdstuk 5 beschrijft een studie, waarin nagegaan werd of op basis van de ploïdie graad en het percentage cellen in de S-fase van de celcyclus, de prognose van de patient voorspeld kon worden. Aneuploïde tumoren bleken met een kortere ziektevrije overleving geassocieerd. Dit gold vooral voor tumoren, die reeds uitgezaaid waren naar de naburige lymfeklieren (Dukes`C stadium). Voor het percentage S-fase cellen werd hetzelfde gevonden, waarbij een hoog percentage S-fase cellen bleek te voorspellen voor een relatief korte overlevingsduur.

In hoofdstuk 6 worden de beperkingen van DNA metingen met behulp van flow cytometrie beschreven. Tevens wordt aangegeven waarom het meten van dynamische kenmerken van tumor-groei met behulp van de inbouw van bromodeoxyuridine (BrdU) in het DNA van delende cellen, gewenst is. Dergelijke studies vormen het tweede deel in dit proefschrift.

Hoofdstuk 7 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe flow cytometrische techniek voor het aantonen van BrdU, dat ingebouwd is in kernen van delende cellen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van monoclonale antilichamen, die voor dit doel gemaakt werden. De techniek maakt gebruik van een pepsine digestie van in ethanol gefixeerde cellen of stukjes weefsel, gevolgd door een denaturatie van het DNA in zuur milieu, teneinde het BrdU beschikbaar te maken voor het antilichaam. Deze methode resulteerde in een verhoogde gevoeligheid ten opzichte van eerder beschreven methodes en kon worden toegepast op beenmerg cellen en cel lijnen. De opbrengst aan losse kernen, verkregen na pepsine digestie, was hoog. Dit alles maakt deze techniek zeer geschikt voor cel kinetiek studies van solide tumoren.

In hoofdstuk 8 werd deze pepsine digestie uitgetest op weefselcoupes. Door pepsine digestie, voorafgaande aan de DNA denaturatie in zuur milieu, bleek de anti-BrdU immunoreactiviteit toe te nemen. Deze toename van immunoreactiviteit was afhankelijk van het gebruikte fixatief. Wanneer cross-linkende fixatieven gebruikt werden, zoals formaline of glutaraldehyde, konden hogere pepsine concentraties gebruikt worden, zonder dat de morfologie werd aangetast.

Hoofdstuk 9 beschrijft een snelle en eenvoudige immunocytochemische methode voor het simultaan aantonen van antigeen expressie en S-fase cellen met behulp van anti-BrdU antilichamen. Voor deze dubbelkleuring werd de DAB kleur modificatie met behulp van cobalt ionen gebruikt. Er werd aangetoond dat de antigeen lokalizatie niet beïnvloed werd door de BrdU kleuring. Deze methode kan worden toegepast op vries- of paraffine coupes en op cytopspin preparaten en maakt cel kinetiek studies van heterogene cel populaties mogelijk op basis van het antigeen expressie patroon.

In hoofdstuk 10 werden de cel kinetische parameters van 13 dikke darm tumor cellijnen bepaald met behulp van de BrdU incorporatie techniek. Tussen diploide en aneuploide cellijnen bleken geen systematische verschillen in labeling indices, potentiële verdubbellings tijden en groei frakties aantoonbaar. Dit gold voor zowel de in vitro situatie als voor xenograften van cellijnen in naakte muizen. Wanneer de cellijnen ingedeeld werden op basis van de differentiatie graad, bleek dat matig gedifferentieerde tumoren een langere volume verdubbellings tijd hadden dan slecht gedifferentieerde tumoren. Echter, deze verschillen konden niet door verschillen, gevonden in de potentiële verdubbellings tijden, worden verklaard. De conclusie is dat in deze situatie het cel verlies een belangrijke parameter is voor de groeisnelheid van tumoren. De hypothese wordt ontwikkeld dat een proces van terminale differentiatie, leidend tot een voorgeprogrammeerde celdood, de meest waarschijnlijke verklaring is voor de waargenomen verschillen in groeisnelheid.

Hoofdstuk 11 bevat een algemene discussie en benadrukt de biologische en klinische relevantie van dynamische cel kinetische studies.