

BEDEUTUNG DER MOLEKULARBIOLOGIE FÜR DIE DIAGNOSTIK UND PROGNOSE KOLOREKTALER KARZINOME IN DER CHIRURGISCHEN PRAXIS

Michael Dlouhý^a, Miloslav Duda^a, David Kalvoda^a und Petr Beneš^b

^a *II. Chirurgische Universitätsklinik der Palacký-Universität, Olomouc, Tschechische Republik*

^b *Onkologische Universitätsklinik der Palacký-Universität, Olomouc, Tschechische Republik*

Eingegangen am 23. September 2000

Key words: Molecular biology / Colorectal cancer / Prognosis

Using the recently developed techniques of molecular biology, staging and follow up of patients with malignant diseases will improve. At the University Hospital in Olomouc, patients suffering from colorectal cancer are registered and a intensive prospective follow up is documented. In addition, a variety of parameters measured with methods using molecular biology is used to describe further the disease of the individual patient. Combining these data, it is hoped, that staging and monitoring of adjuvant treatment is improved.

EINLEITUNG

Der Fortschritt in der Onkologie verschiebt sich heute vom Bereich modernster präklinischen Diagnostik z. B. durch Computertomographie auf die Ebene der einzelnen Tumorzellen, wo durch molekularbiologische Methoden neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Ergebnisse dieser Forschungen von Tumorerkrankungen auf die Ebene der Einzelzellen werden nach heutigen Erkenntnissen in näherer Zukunft eine wichtige Rolle im Kampf gegen Tumoren spielen. Die Mehrzahl dieser Methoden ist leider sehr teuer und auch noch im Stadium der präklinischen Evaluation und so ist ihre Einführung in die alltägliche klinische Anwendung noch mit Problemen verbunden. Bei der Auseinandersetzung mit dieser Problematik muss man sich auch als überwiegend klinisch tätiger Chirurg sehr gut informieren und sich mit neuen Erkenntnissen vertraut machen und vor dieser Herausforderung nicht zurückschrecken^{16, 17}.

Die Analytik des genetischen Materials einer Tumorzelle dient zur Präzisierung der Tumordiagnostik und möglicherweise auch in Zukunft zum Monitoring des Erfolges einer Tumortherapie und zur prognostischen Beurteilung einer Tumorerkrankung. Auf der Analyse von Einzelzellreaktionen beruht auch die sog. Tumormmunologie^{2, 20}. Aus diesen beiden Forschungsrichtungen dürften in Zukunft die Hauptimpulse für Therapiestrategien gegen Tumoren erwachsen. Im Augenblick gilt jedoch weiterhin, dass die wesentliche therapeutische Maßnahme eine radikale chirurgische Entfernung des Tumors ist. In zweiter Linie treten dann adjuvante Chemo- und Radiotherapien bzw. jetzt langsam auch zunehmend die sog. Immuntherapie in Aktion. Durch die Untersuchung des Tumorgewebes mit den o. g. molekularbiologischen Methoden verschiebt sich die

Bewertung eines Tumorleidens von der reinen diskreten morphologischen Betrachtung zu einer mehr funktionell molekularbiologisch bestimmten^{1, 7, 10, 19}. Eine wichtige Charakterisierung von Tumorzellen sind quantitative Veränderungen in DNA-Gehalt. Eine hierzu zu verwendende Methode ist die sog. Durchflußzytometrie. Es hat sich herausgestellt, dass z. B. die Zahl vorhandener Chromosomensätze in einer Tumorzelle einen prognostisch relevanten Faktor darstellt, eine solche Untersuchung kann mit der Durchflußzytometrie gut durchgeführt werden. Wir selbst verwenden darüber hinaus noch die Methode des Nachweises bestimmter intrazellulärer Bestandteile der DNA oder intrazellulärer Proteine, die durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden können und die ebenfalls relevante Prognoseparameter für das Tumorleiden darstellen^{3, 9, 14, 15}.

KONZEPT DES VORGEHENS IN OLOMOUC

Der gesamte Bereich der Forschung auf zellulärer Ebene entwickelt sich auch bei uns sehr intensiv und ist in rascher Bewegung. Um hierbei die Übersicht zu behalten und Methoden zu entwickeln, die in der klinischen Praxis gut anwendbar sind, ist es erforderlich, ein Schema für das diagnostische Vorgehen aufzustellen^{5, 6, 11, 12}. Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen des gewonnenen Materials muss die Präzisierung der Tumordiagnostik, das Monitoring der Tumorerkrankung und die Dokumentation der Reaktion auf Antitumortherapien sein, so dass das Ergebnis dieser Forschungen direkt dem Patienten im Sinne einer Therapieoptimierung zu Gute kommt^{4, 8, 13, 18}. Dafür ist es nötig, umfangreiche statistische Erhebungen im Sinne von

Tumorregistern zu bilden, bei denen möglichst viele Parameter mit der Prognose der Patienten korreliert werden müssen. In dieser Phase befinden wir uns in der Gegenwart in Olomouc und wir standardisieren die durchzuführenden Untersuchungen im Rahmen einer prospektiven Untersuchung.

ERGEBNISSE

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in unserer Population ist sehr hoch²¹. Die Tschechische Republik nimmt in der europäischen Statistik leider einen der ersten Plätze ein. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen ein allmähliches Ansteigen der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Tschechien, im Bezirk Olomouc und in Bezug auf unsere eigene Klinik, die eine der vier chirurgischen Erfassungsstellen in unserem Bezirk ist. In

den letzten 10 Jahren haben wir in unserer Klinik insgesamt 253 Kranke an einem kolorektalen Karzinom operiert, bei denen insgesamt 265 radikale und palliative Eingriffe durchgeführt wurden (Tab. 1). Die Lokalisation des kolorektalen Karzinoms in diesem Krankengut entspricht dabei den bereits bekannten statistischen Verteilungen (Tab. 2). Die Ergebnisse unserer chirurgischen Therapie bei diesem Krankengut zeigt Tabelle 3. Tabelle 4 zeigt die klassischen onkologischen Marker mit Spezifität für das kolorektale Karzinom. Die Ergebnisse dreier Parameter zur Beurteilung der Zellaktivität werden in den Tabellen 5, 6, 7 und 8 angezeigt. Diese Daten geben den hohen Stand der Aktivitäten der Tumorforschung im Bereich der zellulären und subzellulären Strukturen in Olomouc wieder, diese Ergebnisse beruhen auch auf einer internationalen Zusammenarbeit mit verschiedenen Labors.

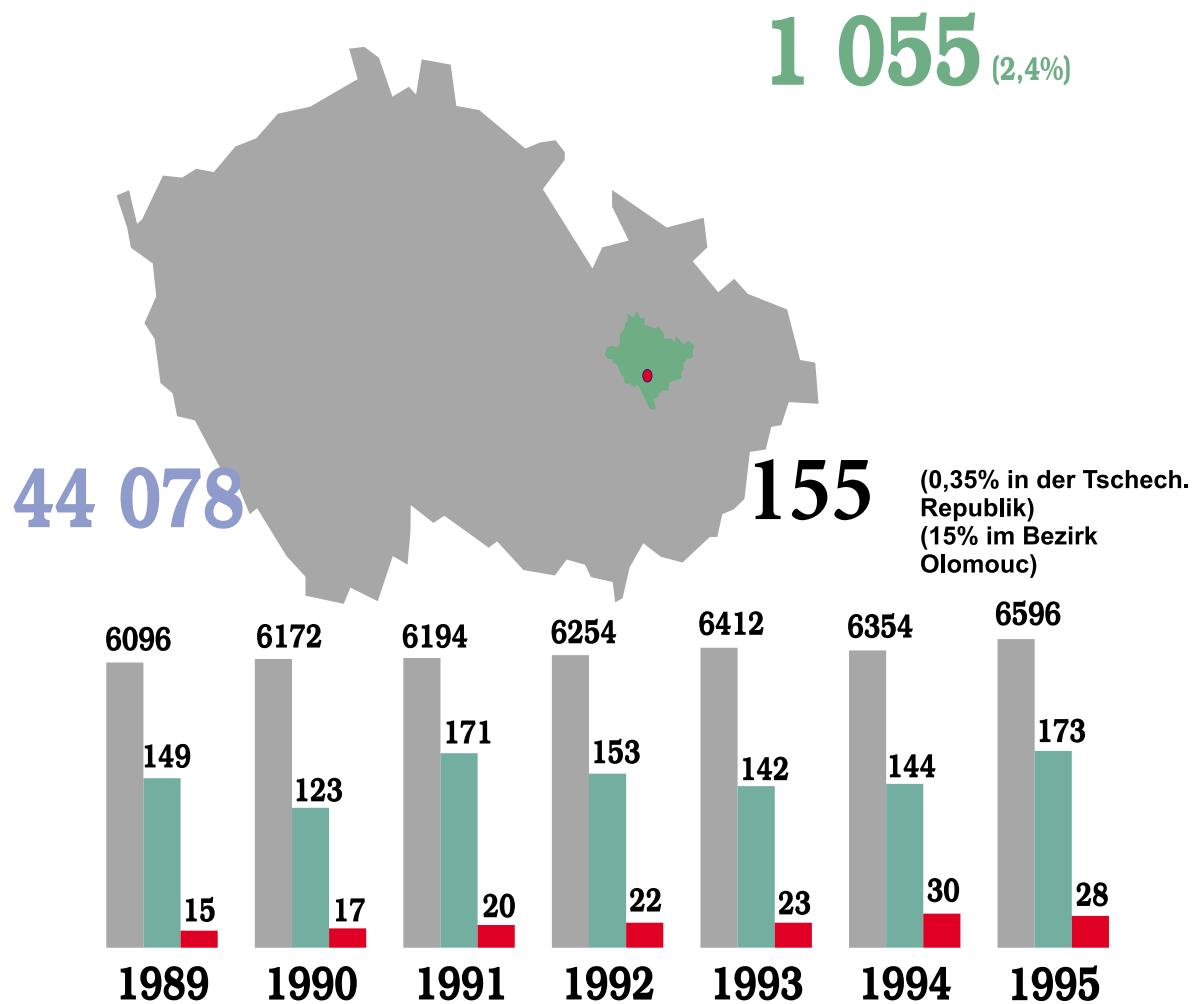


Abb. 1 Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in der Tschechischen Republik, im Bezirk Olomouc und auf der II. chirurgischen Klinik 1989–1995

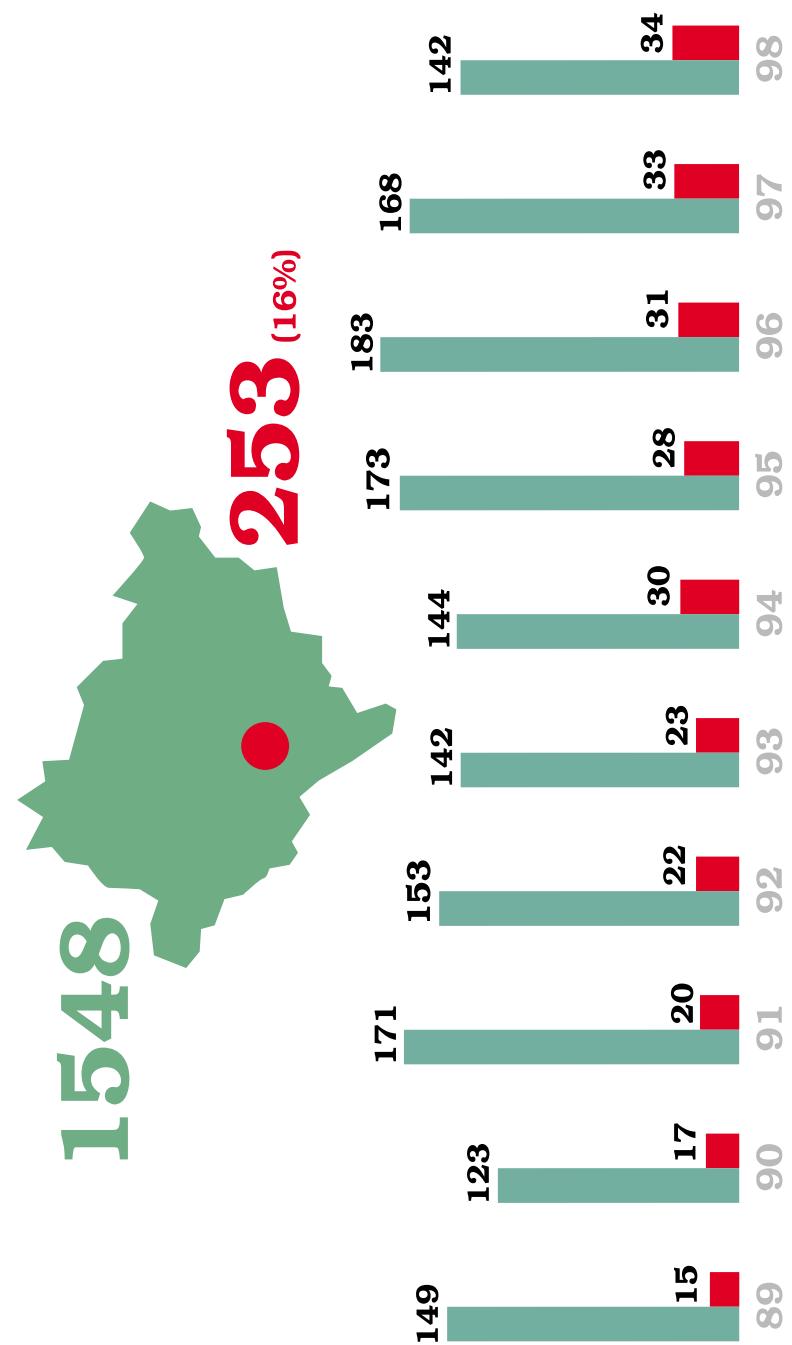


Abb. 2 Inzidenz des kolorektalen Karzinoms im Bezirk Olomouc und auf der II. chirurgischen Klinik 1989–1998

Tabelle 1. Chirurgie des kolorektalen Karzinoms
Eigenes Patientenkollektiv 1989–1998

Die Zahl der Kranken	253 (Alter 24–97 J.)
Männer	149 (durchschn. Alter 65.8 J.)
Frauen	104 (durchschn. Alter 65.3 J.)
Die Zahl der Operationen	265
radikale	174
palliative	79
Op. der schwerwiegenden Komplikationen	12

Tabelle 2. Chirurgie des kolorektalen Karzinoms 1989–1998
Tumorlokalisierung und Histologie

Tumorlokalisierung	
Rectum	32.4%
Sigma	25.7%
Rectosigma	16.2%
andere	25.7%
Histologie	
Adenokarzinom	88%
undifferenziertes Karzinom	9%
andere	3%

Tabelle 3. Ergebnisse der chirurgischen Therapie des kolorektalen Karzinoms 1989–1998

Die Zahl der Komplikationen	
belanglosen (Eitern, Wundendehiscenz usw.)	16 (6.3%)
belangvollen (Dehiscenz der Anastomose usw.)	12 (4.7%)
Nachoperative Letalität bis 30 Tage	15 (5.9%) (13x Herzenkollaps, 2x Peritonitis)

Tabelle 4. Klassische onkologische Marker mit Spezifität für kolorektales Karzinom
(Laboratorium der onkologischen Klinik der medizinischen Fakultät Olomouc)

Benennung	Norm
Karzinom-embryonaler Antigen (CEA)	0–5 ng (ev. bis 10 ng)
Karbohydratenantigen (CA 19–9)	bis 37 U/ml
Gewebe-polypeptidenantigen (TPA)	bis 1 ng/ml = 100 U/l
Lipidverbundene Sialsäure (LSA)	bis 22 mg/100 ml = 220 mg/l

Tabelle 5. Übersicht der untersuchten Parameter im Rahmen der Zusammenstellung der prädiktiven Onkologie
(Laboratorium der experimentellen Medizin, Kinderklinik der medizinischen Fakultät und des Fakultätskrankenhauses Olomouc)

- I. Chemoresistenz
- II. Proliferative Aktivität und genetische Stabilität des Tumors
- III. Weitere prognostische Parameter

Tabelle 6. Chemoresistenz

- * Untersuchung der Chemoresistenz in vitro – MTT Test – 38 standardgetesteten Medikamente – TCS⁵⁰
- * Feststellen der Expression der MDR-assortierten Proteine
P – Glykoprotein (WB, FACS, ICC, IHC),
MRP (WB, ICC, IHC),
LRP (WB, ICC, IHC),
Topoisomerase I (WB, ICC, IHC),
Topoisomerase II (WB, ICC, IHC),
Glutathion-S-Transferase (WB, ICC, IHC)
- * Beurteilung der medizinischen Antwort in vivo aus biotischem Material
Das Prozent der apoptotischen Zellen (Morfologie, TUNEL, DNA-Ladder)
Analyse des Zellenzyclus (FACS, WB, ICC, IHC)

Tabelle 7. Proliferative Aktivität und genetische Stabilität des Tumors

- * DNA-Synthese (BrdU Inkorporation, ³H-Thymidin Inkorporation)
- * PCNA (WB, ICC, IHC)
- * Ki67 (ICC, IHC)
- * Zyklin (WB, FACS, ICC, IHC)
- * Ploidität der Tumorzellen (FACS)
- * Analyse des Zellenzyclus (FACS, WB, ICC, IHC)
- * Funktion p53 – Proteinkummulation (WB, ICC, IHC)
- * Veränderungen in TP53 Lokus-Deletion, Amplifikation (FISH)

Tabelle 8. Weitere prognostische Parameter

- * RB (WB, ICC, IHC, FISH)
- * c-myc (SB, WB, ICC, IHC, FISH)
- * n-myc (WB, ICC, IHC)
- * Her2/neu (WB, ICC, IHC, FISH)
- * Die Tumorvaskularisation (Morfologie, CD61)
- * Das Prozent der apoptotischen Zellen (Morfologie, TUNEL, DNA-Ladder)
- * Aktivität der Telomerase (PCR)
- * Feststellung der Länge der Telomeren (SB)
- * Die Expression und Aktivität der Proteine des Zellenzyclus: cdk 1–7, Zyklin A, D, E, B, H, der natürlichen cdk-Inhibitoren: p21, p27, p57, p15, p16 (FACS, WB, ICC, IHC, ELISA, Substrat-phosphorylierung-Teste)
- * Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (ICC, IHC, ELISA, Enzymteste)

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Von der begonnenen prospektiven Untersuchungsreihe erwarten wir einen wesentlichen Beitrag für die Diagnostik und Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom in unserem Einzugsbereich. Wir erhoffen uns eine Optimierung der adjuvanten Therapie und möglicherweise auch Ansätze für neoadjuvante Therapien. Weiterhin wird in Zukunft über die Erweiterung der Analytik und die Einführung neuer Therapien, z. B. spezifischer Vaccinationen, nachzudenken sein.

LITERATUR

1. Arnold, M. W., Young, D. M., Hitchcock, C. L., Barbera-Guillem, E., Nieroda, C., Martin, E. W. jr. (1998) Staging of colorectal cancer: biology vs. morphology. *Dis. Colon Rectum*, *41*, 12, 1482–1487.
2. Baba, S. (1998) Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World J. Surg.*, *21*, 678–687.
3. Brown, T., Aldous, W., Lance, R., Blaser, J., Baker, T., Williard, W. (1998) The association between telomerase, p53, and clinical staging in colorectal cancer. *Am. J. Surg.*, *175*, 364–366.
4. Calaluce, R., Miedema, B. W., Yesus, Y. W. (1998) Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *J. Surg. Oncol.*, *67*, 194–202.
5. Caldas, C. (1997) Molecular staging of cancer: is it time? *Lancet*, *350*, 9073, 231.
6. Chung, D. C. (1998) Molecular prognostic markers and colorectal cancer: the search goes on. *Gastroenterology*, *114*, 1330–1332.
7. Dietel, M. (1998) Molecular pathology of colorectal cancer: from phenotype to genotype. *Recent Results Cancer Res.*, *1946*, 3–19.
8. Dutta, S. K., Nair, P. P. (1998) Noninvasive detection of colorectal cancer by molecular tools: coming on age. *Gastroenterology*, *114*, 1333–1335.
9. Fujiwara, T., Tanaka, N. (1998) Molecular surgery for human colorectal cancer with tumor suppressor p53 gene transfer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, *99*, 463–468.
10. Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redstrom, M., Gallinger, S., Couture, J. (1997) Molecular biology of colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer*, *21*, 233–300.
11. Itoh, F., Yamamoto, H., Fukushima, H., Matsuno, K., Imai, K. (1998) Recent advance of prognostic factor in human colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, *25*, 2028–2035.
12. Jen, J., Johnson, C., Levin, B. (1998) Molecular approaches for colorectal cancer screening. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, *10*, 213–217.
13. Jessup, J. M., Loda, M., Bleday, R. (1998) Clinical and molecular prognostic factor in sphincter-preserving surgery for rectal cancer. *Semin. Radiat. Oncol.*, *8*, 1, 54–69.
14. Johnson, P. G., Allegra, C. J. (1995) Colorectal cancer biology: clinical implication. *Semin. Oncol.*, *22*, 5, 418–432.
15. Laurent-Puig, P., Cugnenc, P. H. (1997) The application of molecular techniques in the management of colorectal cancer. *J. Chir. (Paris)*, *134*, 279–282.
16. Lynch, H. T., Lemon, S. J., Karr, B., Franklin, B., Lynch, J. F., Watson, P., Tinkley, S., Lerman, C., Carter, C. (1997) Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, *6*, 987–991.
17. Muto, T. (1998) Colorectal carcinogenesis: a historical review. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, *99*, 351–356.
18. Schackert, H. K., Hahn, M., Pistorius, St., Saeger, H. D. (1999) Präventive Chirurgie des vererbten colorektalen Carcinoms als Folge molekularer Diagnostik. *Chirurg.*, *70*, 345–352.
19. Smyth, J. P. (1996) Cancer genetics and cells and molecular biology. Is this the way forward? *Chest*, *109*, 5suppl, 125S–129S.
20. Spataro, V. (1998) Recent advances in the molecular genetics of cancer second joint conference of the American Association of Cancer Research and the European Association of Cancer Research. *Ann. Oncol.*, *9*, 1, 23–29.
21. Tomlinson, I., Ilyas, M., Novelli, M. (1997) Molecular genetics of colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, *16*, 1–2, 67–79.