

Onderzoek naar de groeikinetiek van niet-kleincellig longcarcinoom in relatie met bcl-2 oncogen expressie

I. VERMES, F.A.J.T.M. van den BERGH, G. van der SLUIJS VEER, W.F.A. GROSE, F.M.F.G. OLTHUIS en C. HAANEN

Recent werd beschreven dat expressie van het bcl-2 oncogen in geval van niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) een gunstige prognostische betekenis heeft, zoals blijkt uit een hoger 5-jaars overlevingspercentage. Omdat ook bekend is, dat bcl-2-expressie het optreden van apoptose remt in folliculair lymfoom en in hematopoïetische cellijnen, is het de vraag of de expressie van bcl-2 bij NSCLC mogelijk wijst op een ander groeimechanisme van de tumor, waarbij de groei niet het gevolg is van celproliferatie maar van een vertraagd celversterf.

In dit project zal onderzocht worden in hoeverre de expressie van het bcl-2 oncogen bij NSCLC inderdaad gepaard gaat met een ander type groeikinetiek. Daartoe wordt in een aantal tumoren van NSCLC-patiënten de mate van bcl-2-expressie gecorreleerd aan parameters van proliferatie en apoptose. Het al of niet bestaan van een verband tussen bcl-2-expressie en genoemde parameters zal mogelijk een antwoord geven op de vraag of bcl-2-eiwit positieve NSCLC's wel of niet een karakteristieke groeikinetiek hebben en biologisch te onderscheiden zijn van de bcl-2-eiwit-negatieve NSCLC's.

De groeisnelheid en daarmee samenhangend, de therapiegevoeligheid en prognose van tumoren worden bepaald door de omvang van de groeifractie (GF, het percentage cellen dat in cyclus is), de celcyclustijd (T_c) en het celverlies per tijdseenheid (1). Afgezien van technische problemen bij het bewerken van een tumorspecimen, kan men in de meeste gevallen de GF van een tumor meten door bepaling van het Ki-67 antigeen, dat alleen aantoonbaar is in de kernen van cellen, die in cyclus zijn (2). Men kan de in vivo potentiële tumorverdubbelingstijd (T_{pot}) meten na toediening van jododeoxyuridine (IdU) enige uren voordat een tumor wordt verwijderd. Het principe van deze meting bestaat eruit dat men het percentage cellen meet, dat met IdU gelabeld is (LI, labelingsindex) en de snelheid waarmee het cohort gelabelde cellen door de S-fase van de celcyclus loopt, waaruit men de duur van de S-fase (T_s) kan afleiden. Uit de LI en de T_s kan men de T_{pot} van de tumor berekenen (3).

Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Correspondentie: Dr. I. Vermes, Klinisch Chemisch Laboratorium, Medisch Spectrum Twente, Postbus 50000, 7500 KA Enschede.

Daarnaast zijn er technieken, waarmee men het percentage cellen, dat per tijdseenheid sterft, ofwel apoptotisch wordt, kan bepalen (4-11).

De betekenis van apoptose voor het tumorgroeigedrag is pas de laatste jaren duidelijk geworden. Bij de apoptose is een aantal genen (Fas, bcl-2, p53) betrokken. Het proto-oncogen bcl-2 (B Cel Lymfoom) werd ontdekt doordat het betrokken is bij een chromosomale translocatie (t14,18), welke voorkomt in 85 % van folliculaire non-Hodgkin lymfomen. Overexpressie van het bcl-2 gen verlengt de overleving van de B-lymfocyten, doordat deze beschermd zijn tegen het ondergaan van apoptose. Bij dit lymfoom hebben de tumorcellen een groeivoordeel, niet omdat zij sneller groeien, maar omdat ze langer leven en niet onderhevig zijn aan apoptose (12,13). De lage proliferatiesnelheid verklaart tevens het indolent groeigedrag en de relatieve ongevoeligheid van de tumor voor cytotoxische middelen en voor bestraling.

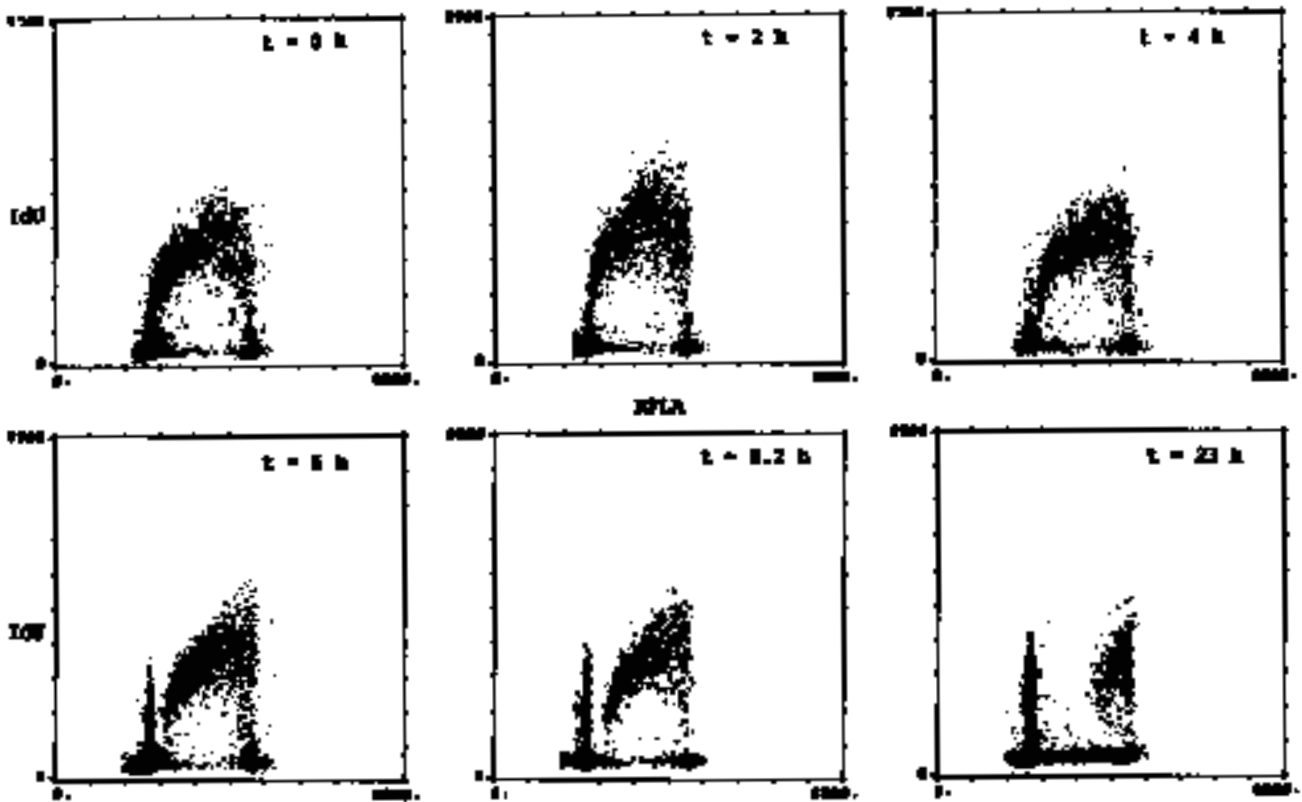
Expressie van het bcl-2 gen komt niet alleen voor bij bepaalde lymfomen, maar werd o.a. ook aangetoond bij meer dan 20 % van de niet-kleincellige longkankers (NSCLC) (14). Patiënten met bcl-2-eiwit positieve NSCLC bleken een langere 5-jaars overleving te hebben dan de bcl-2-eiwit-negatieve NSCLC. Dit gold voor de groep als geheel ($p < 0,1$), maar met name voor het plaveiselcelcarcinoom ($p < 0,02$). Waarschijnlijk wordt de groeisnelheid van deze tumoren niet zozeer bepaald door de celdelings-activiteit van de cellen, maar door het feit dat de tumorcellen niet afsterven.

In dit onderzoekproject, dat past in onze onderzoeklijn, wordt de hypothese getoetst dat een toegenomen expressie van het bcl-2 oncogen bij NSCLC een aparte vorm van tumorgroei inhoudt, waarbij de proliferatiesnelheid geringer is en de apoptose lager is dan bij de bcl-2-eiwit negatieve NSCLC.

MATERIAAL EN METHODEN

Onderzoekplan

Het onderzoekplan omvat een aantal in het laboratorium reeds ingevoerde technieken voor het meten van celegenschappen en celkinetiek met hulp van flowcytometrie (FCM) en daarnaast het aanpassen van lopende en het opzetten van nieuwe methodieken voor de kwantitatieve bepaling van gen-expressie. Voor dit laatste wordt gebruik gemaakt van de polymerase ketting reactie (PCR). Zowel "time resolved" fluorometrie (TRF) als HPLC lenen zich voor toepassing in



Figuur 1. Tweeparameter dot-plot van IdU/DNA flow cytometrie van in vivo gelabelde cellen bij een patiënt met prolifererende blasten in het circulerende bloed. Op verschillende tijden na IdU labeling werd een monster bloed genomen. Op de ordinaat zijn de S-fase cellen zichtbaar, die direct na labeling het IdU hebben ingebouwd. Op de abscis ziet men het DNA-gehalte in de cellen, toenemend vanaf 2n DNA (G_0/G_1 cellen) tot 4 n DNA (G_2/M fase cellen), daartussenin de S-fase cellen. Men ziet dat het cohort IdU-gelabelde cellen in de tijd door de S-fase loopt en na deling terugkeert in het G_0/G_1 -compartiment. Op tijdstip 23 uur ziet men een populatie cellen die het G_2/M -compartiment heeft bereikt en een tweede, grotere populatie die inmiddels na deling is teruggekeerd in het G_0/G_1 -compartiment.

ons laboratorium, waar faciliteiten voor PCR voorhanden zijn.

De Afdeling Pulmonologie van het ziekenhuis (dr. L.L.J. van der Maas en A. van Knapen, longartsen) fungeert als een centrum voor longtumoren in de regio. Per jaar worden ca. 200 nieuwe patiënten met longkanker verwezen. In dit project wordt de hypothese getoetst of bij patiënten met bcl-2-eiwit-positieve NSCLC de tumorcellen niet zozeer prolifereren, maar verminderd afsterven. Daartoe worden parameters van de celgroei en de bcl-2-expressie gemeten in tumor-specimina van veertig tot zestig patiënten met NSCLC bij wie in de loop van twee jaar een tumorresectie plaatsvindt.

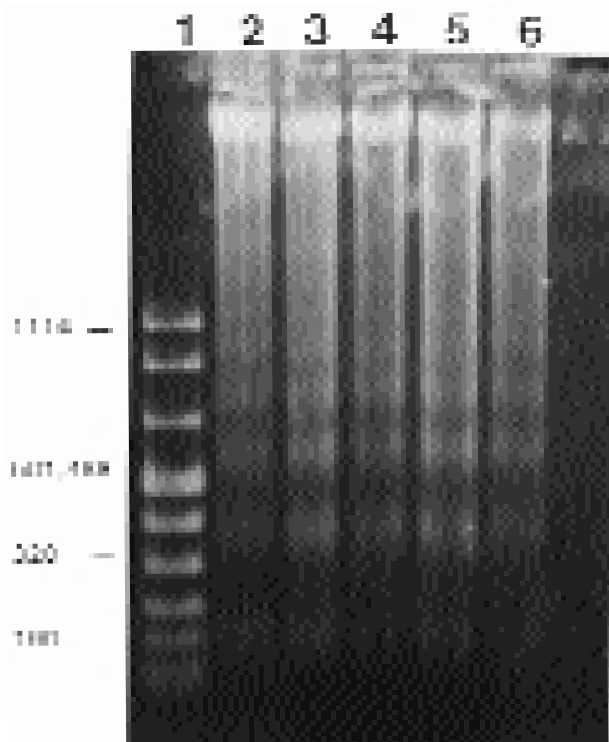
Te verwachten is dat bij $\pm 20\%$, d.w.z. bij $\pm 8-12\%$ van deze patiënten een bcl-2-eiwit positieve tumor zal worden gevonden. Indien de hypothese juist is, dan zullen bij de bcl-2-eiwit positieve NSCLC 's een lagere GF, een langere Tpot en minder apoptose worden gevonden dan de bcl-2-eiwit negatieve NSCLC 's.

De klinische betekenis van dit onderzoek houdt in dat in geval de hypothese juist zou blijken, de groei van een NSCLC met bcl-2-expressie een apart karakter heeft. Dat zal niet alleen het verschil in overlevingsduur en prognose verklaren, maar tevens zal dit van belang zijn bij de keuze van de optimale therapie.

Uitvoering

Meting van de celproliferatie ex vivo

Wanneer men iemand een pyrimidine-analoon, b.v. jododeoxyuridine (IdU) toedient dan wordt dit ogenblikkelijk ingebouwd in het DNA van alle cellen, die zich op dat moment in de DNA-synthese-fase (S-fase) bevinden. Met een monoclaal antilichaam gekoppeld aan fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) kan men middels immunofluorescentie deze S-fase cellen zichtbaar maken en hen quantificeren met flowcytometrie (FCM). Men kan aldus nauwkeurig het percentage gelabelde cellen, de Labelings-Index (LI), vaststellen (figuur 1). Met hulp van een fluorescerende kleurstof, welke zich aan DNA bindt (propidiumjodide, PI), kan dan met FCM het relatief DNA-gehalte in cellen worden gemeten (DNA-FCM) en kan het percentage cellen in de verschillende compartimenten van de celcyclus berekend worden. Met tweeparameter FCM kan men per cel tegelijkertijd het relatief DNA-gehalte (PI) en het IdU/DNA-complex (FITC) meten, waaruit de RM kan worden berekend. Wanneer men aan iemand IdU toedient en op een vastgestelde tijd daarna (± 4 tot 6 uur) een monster neemt van het tumorweefsel, dan kan men uit de afstand, die het cohort gelabelde cellen in die tijd door het S-fase compartiment heeft afgelegd (figuur 1), de tijd berekenen welke de cellen in de S-fase doorbrengen (Ts).



Figuur 2. Karakteristieke ladder waargenomen bij apoptose, geïnduceerd met dexamethason. Het DNA is geïsoleerd uit perifere lymfocyten volgens de zoutextractiemethode van Miller (35). 10 µg DNA wordt opgebracht in een droge well in een 2% agarosegel. Na de elektroforese wordt de gel gekleurd met EtBr.

De RM is de gemiddelde positie van IdU-gelabelde cellen ten tijde van de bemonstering, waarbij de cellen, die inmiddels een mitose hebben doorgemaakt buiten beschouwing worden gelaten. De Ts wordt dan berekend uit de RM en de tijd die is verlopen tussen de IdU toediening (T_0) en het nemen van het tumormonster (T_1). Uit de berekende Ts en de gemeten LI kan men dan de potentiële verdubbelingstijd (T_{pot}) van de tumor berekenen volgens de methode van Begg et al (3):

$$T_s \text{ (uren)} = \frac{0,5}{(RM - 0,5)} \times (T_1 - T_0)$$

$$T_{pot} \text{ (dagen)} = \frac{T_s}{LI} \times \frac{100}{24}$$

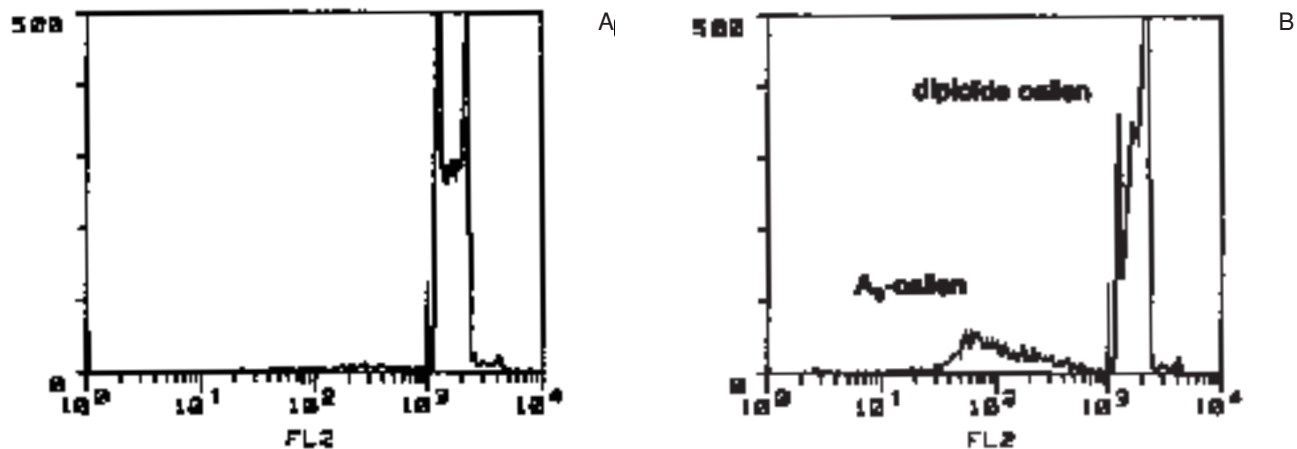
Voor een optimale toepassing van het celkinetisch onderzoek moet een aantal technische en praktische problemen worden overwonnen:

1. Het probleem van de heterogeniteit van het te onderzoeken celmonster als gevolg van verontreinigende ontstekingscellen, bindweefselcellen e.d. De met FCM verkregen informatie is daardoor niet goed te interpreteren, aangezien men niet weet in hoeverre deze betrekking heeft op de tumorcellen en in hoeverre op contaminerende cellen.
2. Binnen de tumorcelpopulatie bestaat ook heterogeniteit: een deel behoort tot het progenitorcelcompartiment, een deel proliferereert en een deel is niet in cyclus en toont soms een zekere mate van uitrijping.

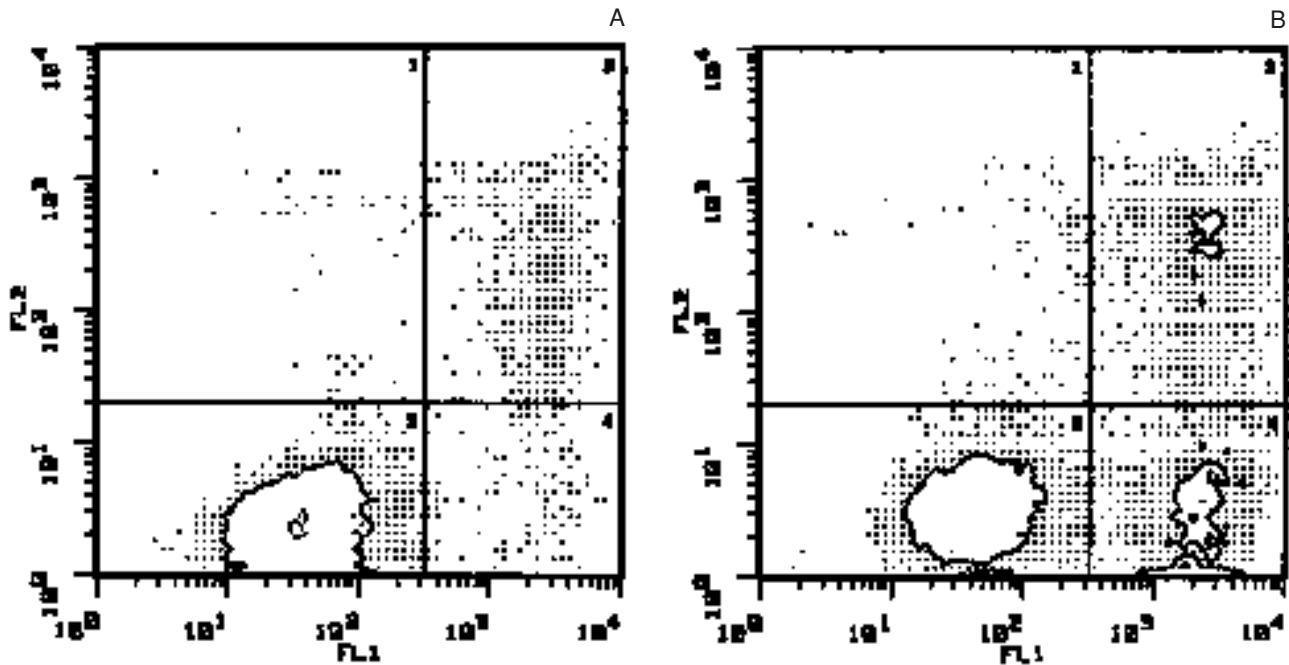
In ons laboratorium bestaat op gebied van celscheidings- en celkinetisch onderzoek aanzienlijke ervaring (16-20).

Meting van apoptose in vitro

Er zijn diverse methoden waarmee apoptose van cellen kan worden vastgesteld. De oudste, minst objectieve methode is de licht- en elektronenmicroscopie. Als gouden standaard geldt het waarnemen van een ladderpatroon bij DNA-elektroforese (figuur 2), als uiting van de endonuclease-activiteit, waardoor het DNA tot nucleosomen wordt afgebroken (9). Het is een specifieke en gevoelige methode, die echter geen individuele celkinetiek van het proces toelaat. Er bestaan ook flowcytometrische methoden (5,21), zoals meting van het scattersignaal (10), van opname / uitsluiting van niet-vitale kleurstoffen, zoals propidiumjodide (8). Bij DNA-FCM van apoptotische cellen vindt men een aantal met een verminderde DNA kleuring (figuur 3). Men ziet dan een sub- G_0/G_1 piek



Figuur 3. DNA-FCM volgens Nicoletti et al (21). Op tijdstip 0 uur (A) en 8 uur na bestraling met 6 Gy (B) worden de HSB-2-cellen gekleurd met propidiumjodide in een hypotoon milieu. De apoptotische cellen tonen verlies van kleurbaar DNA en komen terecht in het hypodiploïde compartiment (A_0 -cellen).



Figuur 4. Contourdiagram van twee parameter FCM (FITC-Annexine V / PI) van de HSB-2-cellen na 6 Gy straling op tijdstip 0 uur (A) en na 8 uur (B). Kwadrant linksonder, toont de vitale cellen: negatief voor Annexine V, negatief voor PI. Kwadrant rechtsboven, toont de niet-vitale, necrotische cellen: positief voor Annexine V, positief voor PI. Kwadrant rechtsonder, toont de apoptotische cellen: positief voor Annexine V, negatief voor PI.

en men noemt deze cellen A_0 -cellen (21). Men veronderstelt dat deze verminderde kleurbaarheid het gevolg is van toenemend verlies van DNA uit de cellen, veroorzaakt door de endonuclease-activiteit en de er op volgende lekkage van laagmoleculaire DNA brokstukken uit de cellen. In tegenstelling hiermee blijft het DNA van necrotische cellen aanvankelijk nog goed kleurbaar. Een heel vroeg symptoom van apoptose wordt gevormd door een conformatieverandering in de celmembraan, waarbij fosfatidylserine (PS) van de cytosolzijde omklapt naar de buitenzijde van de celmembraan (22). In ons laboratorium werd samen met Dr. C.P. Reutelingsperger (Universiteit Limburg, Afd. Biochemie) een nieuwe gevoelige methode ontwikkeld om apoptose aan te tonen, berustend op het feit dat Annexine V een sterke affiniteit heeft voor PS (23,24). Met DNA-clonering kreeg Reutelingsperger Annexine V zuiver in handen, waarna dit werd gekoppeld aan fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC). Het Annexine V-FITC-complex hecht zich ogenblikkelijk aan cellen, die apoptose ondergaan, die daarna met FCM kunnen worden gedetecteerd en gequantificeerd (figuur 4). Daar necrotische cellen PI direct opnemen en apoptotische cellen deze kleurstof de eerste uren nog buitensluiten, kan men met twee-parameter FCM de vitale, de necrotische en de apoptotische cellen onderscheiden en quantificeren. In hoeverre dit principe ook toepasbaar is als methode voor het vaststellen van apoptose in microscopische en in cytocentrifuge preparaten is thans in onderzoek in samenwerking met dr. M.G. Havenith, patholoog (Streeklaboratoria voor Pathologie en Microbiologie in Twente en de Gelderse Achterhoek).

Meting van bcl-2-expressie: niet-isotope RNA-PCR
Het werkplan omvat de ontwikkeling van een gevoelige

methode voor detectie en kwantificering van bcl-2-expressie op mRNA niveau. Isolatie van RNA vindt plaats met guanidine-thiocynaat-phenol-chloroform extractie (25). Een kleine hoeveelheid cellen ($10^4 - 10^5$) is hiervoor voldoende. Conversie van RNA naar cDNA vindt plaats met reverse transcriptase (AMV RT, Boehringer Mannheim) en een gen-specifieke primer. De gevoeligheid van de toe te passen detectiemethode is zodanig dat volstaan kan worden met een PCR-amplificatie van het bcl-2-gen in een relatief klein aantal cycli van twintig tot vijftwintig. Bij dit aantal cycli is de hoeveelheid PCR-product evenredig aan de hoeveelheid mRNA moleculen in het uitgangsmateriaal. Eén van de amplificatie-primers is aan het 5'-eind gelabeld met een biotinmolecuul. Het PCR-product wordt ingevangen in een met streptavidine gecoate microtiterplaat. Tegelijk met het PCR-product wordt een Europium (Eu^{3+}) gelabeld oligonucleotide in de plaat gepipetteerd. Dit oligonucleotide is complementair aan een sequentie gelegen tussen de amplificatie-primers en waarborgt de specificiteit van de detectie. Het Eu^{3+} -label fluoresceert na excitatie veel langer dan de auto-fluorescentie van het testmonster. De Eu^{3+} -fluorescentie kan daardoor heel specifiek gemeten worden met "time-resolved fluorometrie" (TRF). De Eu^{3+} -detectie is uitermate gevoelig, lineair over een groot bereik en geschikt voor kwantificering van het te detecteren materiaal (26-30).

Een alternatief voor de TRF van PCR-producten is de detectie van de PCR-producten met HPLC. Nieuwe DNA-specifieke cyanine-fluorochromen (TOTO-1, YOYO-1) kunnen de gevoeligheid van DNA-detectie met een factor 50-100 verhogen (31). Er bestaat in het laboratorium ervaring met PCR-technologie (32) en met TRF in de immunochemie (33) alsook met as-

says gebaseerd op PCR (34). Voor zover ons bekend is TRF niet eerder toegepast voor de bepaling van gen-expressie.

Onderzoek naar de aanwezigheid van het gen-expressie produkt, het bcl-2-eiwit, vindt parallel plaats met de traditionele cytochemische kleuring van het te onderzoeken materiaal met in de handel zijnde specifieke monoclonale antilichamen (dr. M. G. Havenith, patholoog).

Literatuur

1. Steel GG. Growth kinetics of tumours: cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Clarendon Press, Oxford, England, 1977.
2. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
3. Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, Kärcher H. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 1985; 6: 620-626.
4. Haanen C, Vermes I. Cel en ziekte. III. Apoptose, de biologische tegenhanger van mitose. *Ned Tijdschr Geneesk* 1993; 137: 1914-1917.
5. Vermes I, Haanen C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 1994; 31: 178-246.
6. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of Inflammation* 1995; 4: 1-11.
7. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* (submitted).
8. Darzynkiewicz Z, Bruno S, DelBino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795-808.
9. Facchinetti A, Tessarollo L, Mazzochi R, Kingston M, Collavo D, Biasi G. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Meth* 1991; 136: 125-131.
10. Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991; 137: 79-87.
11. DelBino G, Darzynkiewicz Z. Camptothecin, teniposide or 4'-(9-acridinylamino)-3-methane-sulfon-m-aniside but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in S phase of HL-60 cells. *Cancer Res* 1991; 51: 1165-1169.
12. Afanasyev VN, Korol BA, Matylevich NP, Pechatnikov VA, Umansky SR. The use of flow cytometry for the investigation of cell death. *Cytometry* 1993; 14: 603-609.
13. Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
14. Harris L. What does BCL-2 mean in solid tumours - Friend or foe? *Ann Oncol* 1994; 5: 388-390.
15. Pezella F, Turley H, Kuzu I, et al. Bcl-2 Protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Eng J Med* 1993; 329: 690-694.
16. Baars J, Brons P, Haanen C, Berkel W van. In vivo measurement of tumour cell kinetics in a patient with myelo- and lymphoproliferation. *Neth J Med* 1991; 39: A 28.
17. Haanen C. Ex vivo meting van de groeisnelheid van hematologische maligniteiten in relatie met therapie en prognose. Proc. Symposium "Hematology, from Bench to Clinic.", Antwerpen, October 22, 1993.
18. Haraldsdottir V, Haanen C, Kalsbeek-Batenburg E, Olthuis F. Cell kinetics in multiple myeloma. VHL Symposium "Flowcytometrie", Zwolle, 13-01-1993 (Poster).
19. Haraldsdottir V, Haanen C, Kalsbeek-Batenburg EM, Olthuis F. In vivo cell kinetics in multiple myeloma. Fifth Internat Symposium Belgium Society Clinical Chemistry. Brugge, 28-05-1993 (Poster).
20. Haraldsdottir V, Haanen C, Kalsbeek-Batenburg E, Olthuis F. S-phase cells of the lympho-plasmocytic compartment in hyperdiploid multiple myeloma are diploid cells. *Cytometry* 1994; (submitted).
21. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991; 139: 271-279.
22. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216.
23. Maurer-Fogy I, Reutelingsperger CP, Pieters J, Bodo G, Stratowa C, Hauptmann R. Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca²⁺ - dependent phospholipid-binding protein. *Eur J Biochem* 1989; 174: 585-592.
24. Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker MC. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 1985; 151: 625-629.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987; 162: 156-158.
26. Dahlén P, Litiä A, Mikkala V-M, et al. The use of europium (Eu³⁺) labelled primers in PCR amplification of specific target DNA. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 143-149.
27. Litiä A, Høgdall E, Dahlen P, et al. Detection of mutation DF508 in the cystic fibrosis gene using allele-specific PCR primers and time-resolved fluorometry. *PCR, Methods and Applications*. Cold Spring Harbor Lab Press, 1992; pp. 157-162.
28. Dahlén P, Carlson J, Liukkonen L, et al. Europium labeled oligonucleotides to detect point mutations: Application to PIZ α_1 -antitrypsin deficiency. *Clin Chem* 1993; 39: 1626-1631.
29. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, et al. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1886-1891.
30. Chan A, Diamandis EP, Krajden M. Quantification of polymerase chain reaction products in agarose gels with a fluorescent europium chelate as label and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Anal Chem* 1993; 65: 158-163.
31. Rye HS, Yue S, Wemmer DE, et al. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2803-2812.
32. Steffens-Nakken H, Zwart G, Bergh FAJTM van den. Validation of Allele-Specific PCR for DNA Typing of HLA-B27. *Clin Chem* 1994 (in press).
33. Sluijs Veer G van der, Soons JWPH. A time resolved fluoro-immuno assay of the IgM-Rheumatoid factor. *Eur J Clin Chem Biochem* 1992; 30: 301-395.
34. Zwart G, Steffens-Nakken HM, Bergh FAJTM van den. Detection of homozygous and heterozygous sickle cell defect using allele specific PCR and time-resolved fluorescence. *Clin Chem* 1994 (in press)
35. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 1215.

Summary

Investigation of grow kinetics in non-small cell lung cancer in relation to bcl-2 oncogen expression. Vermes I, Bergh FAJTM van den, Sluijs Veer G van der, Grose WFA, Olthuis FMFG en Haanen C. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 38-43.

Expression of the bcl-2 oncogene has been described to be a prognostic marker in non-small cell lung cancer (NSCLC) demonstrated by a longer 5-years survival rate. Because bcl-2 expression was found to prevent apoptosis in follicular lymphomas and hematopoietic cell lines, we wondered if the expression of bcl-2 in NSCLC would imply a distinct neoplastic mechanism, in which tumor growth is the result of diminished

cell loss and not the consequence of increased cell production. To investigate to what extent the expression of bcl-2 in NSCLC really affects the growth kinetics of these tumor cells, we intend to measure in tumor specimens of NSCLC patients the extent of bcl-2 expression in relation to proliferation and apoptotic indices. These indices, related to the extent of bcl-2 expression, will possibly provide the answer to the hypothesis that bcl-2 expression in NSCLC implies a distinct tumor biology of bcl-2 protein positive lung cancers compared to bcl-2 protein negative ones.

Key-words: non-small cell lung cancer; bcl-2 oncogene; ki-67 antigen; cell proliferation; apoptosis.

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 43-50

Lange keten meervoudig onverzadigde vetzuren in de perinatale periode

F. A. J. MUSKIET¹, C. M. van BEUSEKOM¹, E. R. BOERSMA² en A. OKKEN³

Lange keten meervoudig onverzadigde vetzuren (LC-PUFA) zijn structurele componenten van membraan fosfolipiden en "precursors" van eicosanoiden. Ze zijn essentieel voor normale groei en ontwikkeling, met name van de hersenen. De foetus en pasgeborene zijn respectievelijk afhankelijk van LCPUFA-transport over de placenta en LCPUFA-opname uit de voeding, aangezien er geen bewijzen zijn dat ze adequate hoeveelheden uit hun "precursor" vetzuren linolzuur (LA) en α -linoleenzuur (LN) synthetiseren. Inadequate perinatale LCPUFA status, met name laag docosahexa-eenzuur (DHA), is geassocieerd met intra-uteriene groeivertraging, (pre)eclampsie, verminderde visuele perceptie en mogelijk met lager intelligentiequotiënt. We vonden dat, vergeleken met matернаal bloed, navelstrengbloed hogere LCPUFA gehalten bevat in cholesterolesters (CE), triglyceriden (TG) en erythrocyten (RBC). LA en LN zijn echter lager. Het verloop van de LCPUFA met de gestatieduur suggereert dat immature peroxysomale β -oxydatie de voornaamste oorzaak is van de lage capaciteit voor de omzetting van LN in DHA. Gegevens van drie tweelingen lieten de hoogste CE en TG LCPUFA gehalten zien in het zwaarste kind, hetgeen suggereert dat lage LCPUFA status een beperkende factor is in de groei. RBC LCPUFA-gehalte is een meer betrouwbare parameter voor postnatale LCPUFA-status dan het plasma CE LCPUFA-gehalte. Bij de geboorte hebben baby's ho-

gere RBC LCPUFA ω 6 en lagere RBC LCPUFA ω 3 dan hun moeders, hetgeen gedurende 3 weken borstvoeding nauwelijks verandert. Het relatieve LCPUFA-gehalte van moedermelk neemt af met de duur van de lactatie. Daarentegen neemt de 24-uurs LCPUFA-uitscheiding toe. De vetzuursamenstellingen van moedermelk uit verschillende landen laten variabele percentages DHA zien. Het relatief lage DHA-gehalte in melk van Westers etende vrouwen wordt veroorzaakt door een hoge maternale LA-inname en een geringe consumptie van vis. Flessemelk bevat verwaarloosbare LCPUFA gehalten. Vergeleken met borstgevoede tegenhangers veroorzaakt het voeden van pasgeborenen met flessemelk lage CE en RBC LCPUFA-gehalten. Toevoeging van ribonucleotiden aan flessemelk vanaf dag 10 veranderde dit beloop niet. Teneinde groeiretardatie te voorkomen dienen flessemelk LA, LN, LCPUFA ω 3 en LCPUFA ω 6 gehalten gebalanceerd te worden op basis van de regulatie van hun gehalten in moedermelk. Melk van vrouwen met een hogere inname van visolie dan in de Westerse wereld levert mogelijk een goede referentie.

In de jaren zeventig had een pasgeborene van 750 gram (normaal à term geboortegewicht \pm 3.500 gram) nauwelijks een kans tot overleven en als dit gebeurde was er een grote kans op neurologische afwijkingen. De toegenomen kennis van de behoeften van de prematuur (\leq 37 weken) en dysmatuur (beneden de 10^e percentiel naar gestatieduur) heeft deze situatie in de afgelopen 20 jaar doen veranderen. Deze kennis kwam onder andere voort uit toenemend inzicht in de gebeurtenissen in de intra-uteriene periode. De daarvoor benodigde samensmelting van de obstetrie en neonatologie heeft geleid tot het aandachtsgebied van de perinatologie.

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Obstetrie & Gynaecologie² en Kindergeneeskunde³, Academisch Ziekenhuis en Rijksuniversiteit Groningen

Correspondentie: Dr. F.A.J. Muskiët, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Groningen, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen.