

DİFFÜZ ASTROSİTOMA OLGULARINDA DNA İÇERİK TAYİNİ

Yasemin BUDAK*, Özlem KURTKAYA**, Gülderen YANIKKAYA DEMİREL*,
Hüseyin BALOĞLU***, Gülbu İŞİTMANGİL*

ÖZET

Bu çalışmanın amacı diffüz astrositoma olgularında flow sitometre (FCM) ve görüntü analizi sistemi (GAS) yöntemi ile ölçülen DNA ploidi indeksi ve/veya proliferatif indeksin histopatolojik gradeleme ile uyumlu olup olmadığını incelemektir. Toplam 29 adet intraserebral diffüz astrositoma olgusu Daumas-Duport sınıflamasına göre gradelendirildi. Altı vaka Grade 2, üç vaka Grade 3 ve yirmi vaka Grade 4 olarak bulundu. Çalışmada flow sitometrede (FCM) Coulter M Plus programı kullanılarak, GAS ise Samba-Ploidy 4000 yazılım programı kullanılarak DNA indeksi (DI) ve proliferatif indeks hesaplandı. Çalışılan 29 vakanın 23 tanesinde FCM ve GAS yöntemleri ile DNA ploidi aynı bulundu. FCM'de; proliferatif indeks açısından incelendiğinde ortalama ve standart sapmalar; Grade 2 için 11.0 ± 6.0 , Grade 3 için 11.4 ± 5.4 , Grade 4 için 17.0 ± 17.2 olarak ölçüldü. GAS'de bu değerler; Grade 2 için 34.6 ± 19.9 , Grade 3 için 26.6 ± 16.0 , Grade 4 için 29.3 ± 18.5 olarak ölçüldü. FCM'de; DNA indeksi açısından incelendiğinde ortalama ve standard sapmalar Grade 2 için 1.31 ± 0.49 , Grade 3 için 1.10 ± 0.40 , Grade 4 için ise 1.57 ± 0.66 olarak saptandı. GAS yönteminde bu değerler, Grade 2 için 1.35 ± 0.54 ; Grade 3 için 2.4 ± 0.86 ; Grade 4 için ise 1.37 ± 0.60 olarak bulundu. DNA indeksi ve proliferatif indeks FCM yöntemiyle ve GAS yöntemiyle ölçüldüğü zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Sonuç olarak her iki yöntemin de tek başına veya birlikte kullandıkları zaman diffüz astrositomaların histopatolojik gradelemesi ile uyumlu olmadıkları tespit edildi ve gradelendirmede kullanılmayacakları öne sürüldü.

Anahtar kelimeler: Diffüz astrositoma, DNA indeksi, proliferatif indeks

SUMMARY

Determination of DNA content within astrocytoma cases. The aim of this study was to evaluate whether the DNA index and/or proliferative index measured by the flow cytometry (FCM) and image analysis (IA) is proportional to histopathological grading of diffuse astrocytomas. Intracerebral diffuse astrocytomas (n=29) were graded according to Daumos-Duport criteria, six of which were Grade 2, three were Grade 3 and twenty were Grade 4. DNA index and proliferative index were calculated by using Coulter M plus program for FCM and Samba-Ploidy 4000 program for IA. Twentythree out of 29 cases were found to have the same ploidy by both of the techniques. The percentage of the proliferating cells were found to be 11.0 ± 6.0 in Grade 2, 11.4 ± 5.4 in Grade 3 and 17.0 ± 17.2 in Grade 4 with FCM. The proliferative index were found to be 34.6 ± 19.9 in Grade 2, 26.6 ± 16.0 in Grade 3 and 29.3 ± 18.5 in Grade 4 with IA. The DNA indices were found to be 1.31 ± 0.49 in Grade 2, 1.10 ± 0.40 in Grade 3 and 1.57 ± 0.66 in Grade 4 with FCM. The DNA indices were found to be 1.35 ± 0.54 in Grade 2, 2.40 ± 0.86 in Grade 3 and 1.37 ± 0.60 in Grade 4 with IA. When these two techniques were compared, any statistically significant difference could not be determined in terms of distinguishing the histopathological groups of different grades from each other. According to the results of this study; the FCM and IA techniques are not proportional to the quantitative histopathology and cannot be used for grading of diffuse astrocytomas.

Key words: Diffuse astrocytomas, DNA index, proliferative index

GİRİŞ

Primer beyin tümörlerinin yıllık insidansı 13/1.000.000'tür. Tedavide bir çok yeni yöntemin uygulanmasına karşın hastaların yaşam süreleri oldukça kısadır. Bu yüzden hastalığın prognozunu öngörmeye ve tedavi planını oluşturmada objektif kriterlere gereksinim vardır. Bunların arasında histolojik sınıflama diffüz astrozitomalarda önemli bir prognostik değişkendir (6).

Flow sitometre ile ölçülen S faz yüzdesi ve Deoksiribonükleik asit İndeksi (DI) meme, over ve kolon gibi birçok kanser türlerinde prognozu öngörmeye kullanılmıştır (13). Çeşitli tümörlerde yapılan araştırmalar (30); diploid tümörlü olguların prognozlarının anoploid ve/veye yüksek S fazı popülasyonuna sahip olgulara göre daha iyi olduğunu göstermektedir.

Beyin tümörleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalara karşın DNA analizi yöntemlerinin bu vakaların prognozunu öngörmedeki rolü belirsizliğini korumaktadır (2,10,22,23,32,33). DNA ploidi ile ilgili çalışmalar flow sitometre (FCM) ve görüntü analizi sistemi (GAS) ile yapılabilmektedir. Her iki yöntemin de farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Flow sitometre yöntemi çok sayıda hücreyi değerlendirebilmesi; görüntü analizi sistemi ise selektiviteye sahip olması açısından anlamlıdır. Flow sitometre yöntemi farklı kökünde hücrelerin morfolojik ayırımının yapılamaması; görüntü analizi sistemi ise kısıtlı sayıda hücre inceleyebilmesi açısından dezavantajlı durumdadır (17). Yapılan bazı çalışmalarda görüntü analizi sisteminin anoploidi ve tetraploidiyi saptamada daha duyarlı olmasına karşın, flow sitometre bulgularının prognoz ile korele olduğu bulunmuştur (24,26,27,28,29).

Bu çalışmanın amacı diffüz astrozitoma olgularında FCM ve GAS yöntemi ile ölçülen DNA ploidi indeksi ve/veya proliferatif indeksin histopatolojik gradelendirme ile uyumlu olup olmadığını ölçmektir.

MATERYAL ve METOD

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalından Patoloji Anabilim Dalına gönderilen ve her iki yöntem için çalışmaya uygun olan 29 adet intraserebral diffüz astrozitom olgusu seçildi. Bu amaçla 1987-1993 tarihleri arasında formalin ile fikse edilerek parafine gömülmüş arşiv materyali kullanıldı.

Çalışma için yaşları 24 ile 66 arasında değişen 20 erkek ve 9 kadından alınan tümör dokuları kullanıldı (Tablo 1). Tüm tümör dokuları iki farklı nöropatolog tarafından incelendi. Diffüz astrozitom olguları atipi, mitoz, vasküler endotelial proliferasyon ve nekrozdan oluşan 4 kriter kullanılarak Daumas-Duport sınıflaması ile gradelendirildi (11). GAS ve FCM çalışmaları, iki farklı merkezde diğer metod analiz sonuçlarını ve histopatolojik gradelemeyi bilmeyen kişilerce bağımsız olarak gerçekleştirildi.

Flow Sitometri

Parafine gömülü 29 adet diffüz astrozitom olgusundan 15 µm lik kesitler alındı. Hedley (14) yöntemi ile ksilen ve derecesi azalan alkollerden geçirilip, distile su ile rehidrate edilerek deparafinizasyon yapıldı.

Daha sonra %0.5'lik pepsin ile 37°C'de yarım saat inkübe edilerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonları 15 ml Hapes-Hanks solüsyonu içinde nötralize edildi.

Hemositometrede hücrelerin konsantrasyonları 3-10 x 10⁶ nükleus/ml olacak şekilde ayarlandı. 100 µl örnek alınarak Coulter-DNA prep solüsyonu ile boyandı. Coulter DNA prep referans kullanılarak FS (Forward Scatter), SS (Side Scatter) ve FL3 değerleri ayarlandı. Parafine gömülü normal beyin dokusundan eş zamanlı olarak elde edilen hücre süspansiyonu kontrol olarak kullanıldı. Örnekler 2 saat içerisinde Coulter- Epics XL

Tablo 1. Her iki yöntem için çalışmaya uygun bulunan 29 vakanın GAS, FCM ve histopatolojik gradelendirme sonuçları (A= anoploid, E= oploid, G= grade)

OLGU	YAŞ CİNSİYET	FCM (A/E)	GAS (A/E)	FCM PI (%)	GAS PI (%)	HİSTOLOJİK GRADE	FCM DI	GAS DI
1	49 E	A	A	31.2	21	G4	1.8	1.6
2	64 K	A	A	30.0	72	G4	1.4	1.2
3	54E	A	E	12.4	19	G4	2.1	1.0
4	40 E	A	E	5.8	7	G4	3.4	1.0
5	46 E	A	A	79.5	51	G4	1.7	1.4
6	51 K	A	A	26.0	8	G4	1.2	1.4
7	40 E	E	E	5.3	11	G4	1.0	1.0
8	40 K	A	E	12.9	13	G4	1.9	1.0
9	45 E	A	E	8.0	19	G4	1.6	1.0
10	55 E	E	E	20.6	23	G4	1.0	1.0
11	60 E	A	E	16.8	29	G4	2.7	1.0
12	45 E	A	A	16.7	39	G4	1.9	1.6
13	63 E	A	A	1.5	64	G4	1.7	1.2
14	66 K	E	E	2.7	32	G4	1.0	1.0
15	40 E	E	E	6.1	9	G4	1.0	1.0
16	52 E	A	A	26.3	51	G4	0.8	3.2
17	26 E	A	A	12.3	19	G4	1.5	1.3
18	40 K	A	A	6.2	29	G4	0.8	1.8
19	40 K	E	E	13.5	33	G4	1.0	1.0
20	57 K	A	A	7.0	37	G4	1.9	2.1
21	40 E	A	A	5.1	43	G3	1.1	1.7
22	52 K	A	A	14.0	11	G3	0.7	3.4
23	62 E	A	A	15.0	26	G3	1.5	2.3
24	30 E	A	A	8.3	38	G2	1.9	1.7
25	50 E	E	A	6.1	19	G2	1.0	1.3
26	24 E	E	E	5.5	14	G2	1.0	1.0
27	37 E	E	A	9.7	42	G2	1.0	1.3
28	54 K	E	E	19.2	26	G2	1.0	1.0
29	30 E	A	A	18.1	69	G2	2.0	1.7

Flow sitometrede çalışmaya alındı. Flow sitometrede her bir örnekten en az 10 000 en çok 50 000 hücre çalışıldı. CV (Coefficients of variation) değerleri 6'nın üzerinde çıkanlar tekrar değerlendirmeye alındı.

Görüntü Analizi Sistemi

Parafin bloklardan hazırlanan 8-10 µm kalınlığındaki kesitler flow sitometre için hazırlanan teknikte hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra lamlara tek hücre düze-

yinde yayıldı ve Feulgen pararosanilin tekniği ile boyandı. Axiophote-Zeiss mikroskopa integre JVC 3 chip CCD color kamera ile alınan nükleus görüntüleri, Matrox Magic boardda digitize edilerek SAMBA-Ploidy 4000 (Imaging products International, Chantilly, VA) yazılımı ile DNA içeriği açısından incelendi. İncelemeler manuel modda yapılarak, morfolojik olarak tümör hücresine ait olduğu konusunda kuşku bulunmayan ve optik derinlik netliği ile incelenecek nükleusun konturlarının tamamının kesit içeri-

sinde kaldığı kanısına varılan en az 50 hücre nükleusu seçilerek analiz edildi. Analizler sırasında eksternal kontrol (2c ve 4c kontrol) olarak rat karaciğer dokusu imprintleri kullanıldı. Rat/insan DNA koreksiyonu 5/6 sabiti ile yapıldı.

DNA ANALİZİ

a. Proliferatif İndeks

Proliferatif indeks (PI), total hücre popülasyonunun kaç tanesinin ölçüm anında DNA replikasyonu fazında olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada FCM'de Coulter M Plus programı kullanılarak, GAS'da ise SAMBA-Ploidy 4000 yazılım programı kullanılarak S faz ve G2/M deki hücre yüzdesi (PI) hesaplandı (Tablo 1).

b. DNA İndeksi

Tümör hücrelerinin pikinin referans pike oranı DNA indeksi (DI) olarak tanımlanmaktadır. DI, hücre içindeki DNA içeriğini göstermektedir. G0G1 hücrelerin DNA indeksi 1'dir. DNA indeksinin 0.9-1.1 olduğu tek bir pik DNA diploid olarak tanımlanmaktadır. Eğer başka bir pik varsa tümör DNA'sı anoploid olarak tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada FCM'de Coulter M Plus programı kullanılarak, GAS'da ise SAMBA-Ploidy 4000 yazılım programı kullanılarak DI hesaplanmıştır (Tablo 1).

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSSX Package) kullanılarak yapıldı. S faz yüzdesi ve DNA indeksi ortalama \pm SD olarak hesaplandı. Gruplar *student's t test* ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Daumas-Duport sınıflaması 0 kriter=Grade 1, 1 kriter=Grade 2, 3 kriter=Grade 3, 4 kriter=Grade 4 olarak değerlendirilen skorlama sistemine dayanmaktadır. Nöropatologların

yaptığı değerlendirmeye göre Daumos-Duport sınıflamasına göre gradelendirilen vakaların 6 adedi Grade 2, 3 adedi Grade 3 ve 20 adedi Grade 4 olarak bulundu (Tablo 1). Histopatolojik olarak Grade 3 olarak tanısı konan üç vakanın hepsi FCM ve GAS yöntemleri ile anoploid bulundu (Tablo 1). Histopatolojik olarak Grade 2 olarak tanısı konan 6 vakanın 2 tanesi FCM ile anoploid bulunduğu halde GAS yöntemi ile 4 adedi anoploid bulundu (Tablo 1).

Çalışılan 29 vakanın 23 tanesinde FCM ve GAS yöntemleri ile DNA ploidieleri aynı bulundu (Tablo 1). FCM yöntemi ile ise 20 vakanın 15 tanesi anoploid olarak bulundu (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5). Histopatolojik olarak Grade 4 olarak tanısı konan 20 vakanın 10'u GAS yöntemi ile öploid bulundu (Şekil 6).

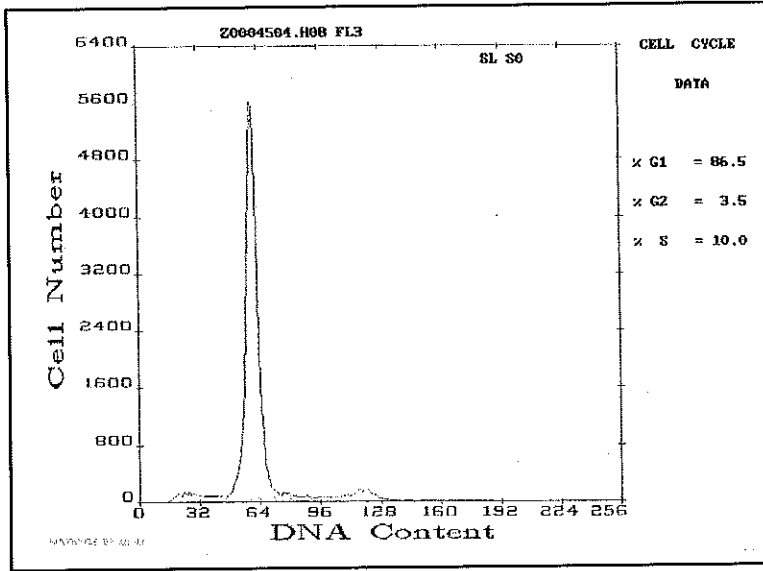
Tablo 2. Ortalama PI ve standard deviasyonları ile PI yüzdelilerinin her iki yöntem ile gradeler arasında istatistiksel yöntemle karşılaştırılması (*student's t test*).

	FCM	GAS
GRADE 2	11.1 \pm 6.0 p>0.05	34.6 \pm 19.9 p>0.05
GRADE 3	11.4 \pm 5.4 p>0.05	26.6 \pm 16.0 p>0.05
GRADE 4	17.0 \pm 17.2 p>0.05	29.3 \pm 18.5 p>0.05

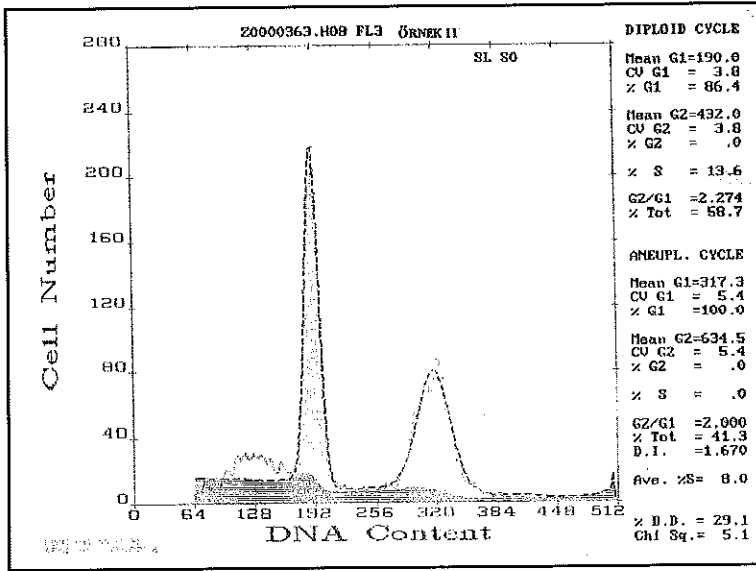
Tablo 3. Ortalama DNA indeksleri ve standart deviasyonları ile DNA indekslerinin her iki yöntem ile gradeler arasında istatistiksel yöntemle karşılaştırılması (*student's t test*).

	FCM	GAS
GRADE 2	1.31 \pm 0.49 p>0.05	1.35 \pm 0.54 p>0.05
GRADE 3	1.10 \pm 0.40 p>0.05	2.40 \pm 0.86 p>0.05
GRADE 4	1.57 \pm 0.66 p>0.05	1.37 \pm 0.60 p>0.05

Şekil 1. Tablo 1'deki 19 nolu hasta



Şekil 2. Tablo 1'deki 9 nolu hasta



Oploidi ve anoploidi bakımından flow sitometrede Grade 2 ve Grade 4 karşılaştırıldığında grade yükseldikçe anoploid olguların yüzdesinde artma görüldü. Görüntü analizi sisteminde ise Grade 2 ve 4 olguları benzer anoploid hücre yüzdesi gösterirken grade 3 olgularının daha yüksek anoploid hücre yüzdesi değerlerine sahip olduğu saptandı.

Flow sitometrede; Proliferatif hücre fraksiyonunda bulunan hücrelerin yüzdesi (PI) açısından incelendiğinde ortalama ve stan-

dart sapmalar; Grade 2 için 11.1 ± 6.0 , Grade 3 için 11.4 ± 5.4 , Grade 4 için 17.0 ± 17.2 olarak ölçüldü. Görüntü analizi sisteminde bu değerler; Grade 2 için 34.6 ± 19.9 , Grade 3 için 26.6 ± 16.01 , Grade 4 için 29.3 ± 18.5 olarak ölçüldü. PI yüzdesi flow sitometrik yöntemle ölçüldüğü zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 2). Aynı şekilde PI yüzdesi görüntü analizi sistemi ile ölçüldüğünde de gradeler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 2).

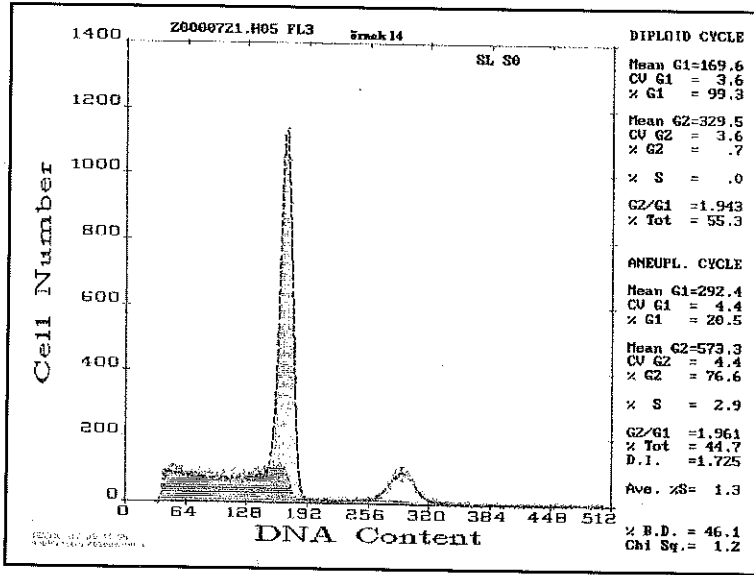
Flow sitometrede; DNA indeksi açısından bakıldığında ortalama ve standart sapmalar Grade 2 için 1.31 ± 0.49 , Grade 3 için 1.10 ± 0.40 , Grade 4 için ise 1.57 ± 0.66 olarak saptandı. Görüntü analizi Sistemi için bu değerler, Grade 2 için 1.35 ± 0.54 , Grade 3 için 2.4 ± 0.86 , Grade 4 için ise 1.37 ± 0.60 olarak bulundu (Tablo 3). DNA indeksi açısından bakıldığında flow sitometrik yöntemle ve görüntü analizi sistemi ile ölçüldüğü zaman gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 3).

TARTIŞMA

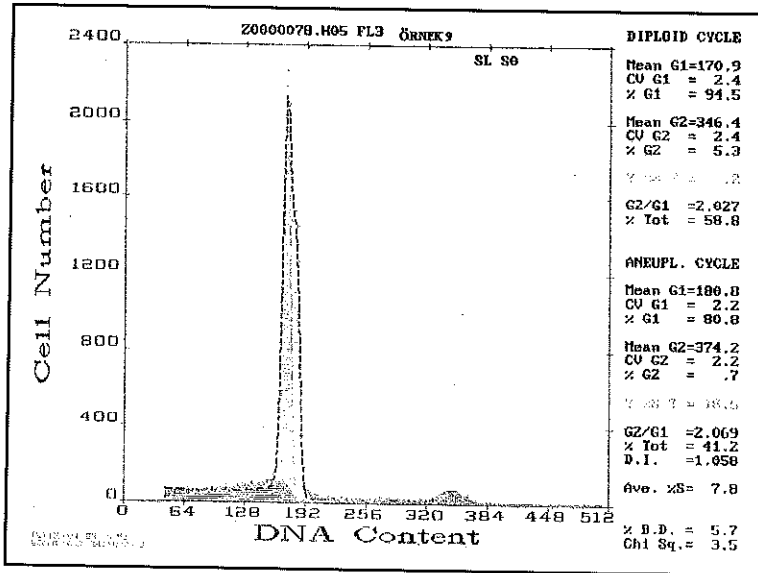
Literatürde farklı tümör dokularında yapılan çalışmalarda grade ve/veya malignite arttıkça anoploidiye rastlanma oranının arttığı gösterilmiştir (7,12,16,19,20).

Beyin tümörleri ile yapılan çalışmalarda bu konuda farklı bulgular vardır. Bookwater ve

Şekil 3. Tablo 1'deki 5 nolu hasta



Şekil 4. Tablo 1'deki 28 nolu hasta



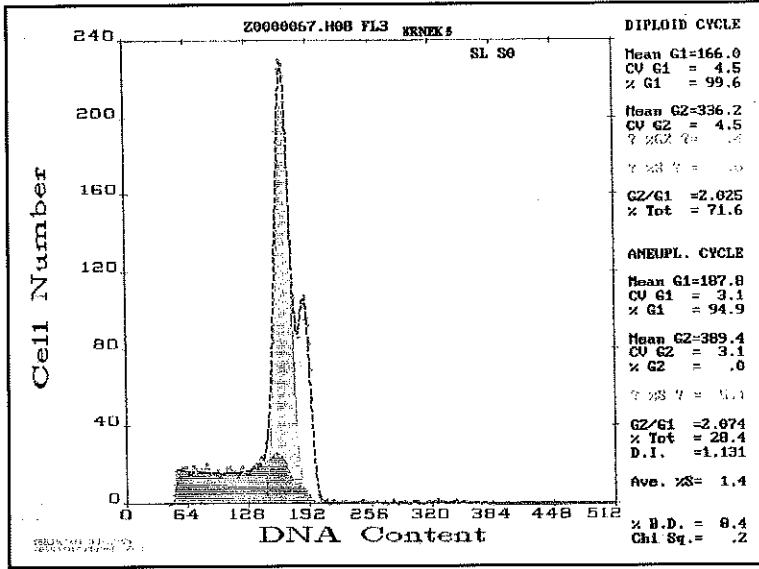
arkadaşları diffüz astrositomalı olgularda yaptıkları çalışmada grade ile anoploidi arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir (5). Coons ve arkadaşları yaptıkları çalışmada glioma tümörlerinde ploidi, proliferatif hücre fraksiyonu ve histolojik özelliklerin birbirinden bağımsız bir şekilde heterojenite gösterdiğini bulmuşlardır ve bu nedenle evreleme ve prognoz tayininde birden çok yöntemin bir arada kullanılması gerektiği sonucuna varmışlardır (8). Coons ve arkadaşları diffüz astrositomalı olgularda yaptıkları çalışmada

ise DNA anoploid tümörü olan tüm hastaların prognozlarının kötü olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada vakaların hızlı gelişiminin tek başına histoloji ve/veya FCM ile tahmin edilmekle beraber her iki yöntemin birlikte kullanımının prognostik öngörüyü arttırdığını tespit etmişlerdir (9).

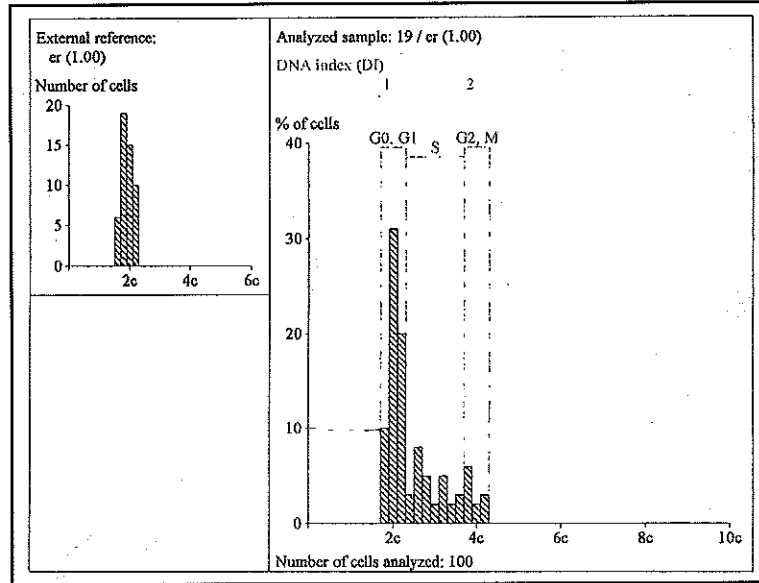
Biz bu çalışmada Grade 4'deki vakaların FCM ile %75'ini, GAS yöntemi ile ise %50'sini anoploid bulduk. Grade 3'deki tüm vakaları her iki yöntemle de anoploid bulduk. Grade 2'deki anoploid vaka yüzdesi diğer grade'lere göre daha düşüktü. Grade 2'de düşük anoploidi ve Grade 4'de yüksek anoploidi görülmesi literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur (7,12,16,19,20). Grade 3'teki tüm vakaların anoploid olması vaka sayısının yetersiz oluşu ile açıklanabilir. GAS ve FCM ile anoploid vaka oranlarını farklı bulunmasını teknik metodların ve çalışılan merkezlerin ayrı oluşuna bağlamaktayız. Teknik metod data analizi de dahil olmak üzere DNA anoploidi oranlarında büyük etkiye sahiptir ve çalışmalarda farklı sonuçların bulunmasına yol açmaktadır (4).

DNA ploidi ölçümlerinde deparafinize doku ile çalışmanın bir çok dezavantajı vardır. Shutte ve arkadaşları kolorektal kanserlerde yaptıkları çalışmada parafin doku ile taze doku karşılaştırıldığında aynı örnekte değişken sonuç bulma olasılığının daha fazla olduğunu göstermiştir (25). Yapılan bir başka çalışmada formalin fiksasyonunun nukleu-

Şekil 5. Tablo 1'deki 21 nolu hasta



Şekil 6. Görüntü analizi sistemi ile alınan histogram örneği



sun boyanma şeklini değiştirdiği gösterilmiştir (3). Aynı çalışmada formalin ile fiks edilmiş dokularda fiksasyon anındaki kromatin yapısının şekline bağlı olarak propidium iodid floresansının yalancı anoploid piklere yol açtığı bulunmuştur. FCM'de tespit edilen GAS'da tespit edilemeyen anoploid populasyonun formalin fiksasyonu sırasında hücre nükleer kontentinin parçalanmasına ve/veya yukarıda bahsedilen boyanmadaki farklılıklara bağlı olabileceğini düşünmekte-

yiz (vaka no 3, 8,9,11). Yalnızca GAS ile tespit edilen vakaların near-diploid anoploid oluşu nedeni ile FCM'de tespit edilemediklerini düşündürmektedir (vaka no 25, 27).

Deparafinize doku ile çalışmanın dezavantajlarına rağmen, parafine gömülü dokular klinik gelişimleri bilinen vakalarda retrospektif ölçümlere olanak sağladıkları için tercih ettik. Parafin dokuda yaptığımız ölçümleri aynı örneklerin taze dokularını kullanarak da çalışabilirdik idik GAS ve FCM'de bulduğumuz farklı sonuçların fiksasyon sırasındaki problemlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını görebilirdik.

Bu çalışmada literatürdeki birçok çalışma ile benzer şekilde PI ve DNA indeksi ile astrositoma gradelemesi arasında bir ilişki olmadığını bulduk (1,15,18,21,31).

DNA indeksi; hücre içindeki DNA kontentini göstermektedir. G0G1 hücrelerin DNA indeksi 1'dir. DNA indeksinin 0.9-1.1 olduğu tek

bir pik DNA diploid olarak tanımlanmaktadır. Tüm hücre nükleusunun DNA flow sitometre yöntemi ile incelenmesi kromozomların yapısını ölçemediği için DNA indeksi 1.0 olan bir hücrenin kromozom yapısının normal olup olmadığını söylemek mümkün değildir.

Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu bir şekilde bu çalışmada hastalığın grade'i ile proliferatif indeks arasında anlamlı bir artış olmadığını gördük (1,15,18,21,31). Yapılan ça-

Işımlarda GAS metodu ile bulunan PI, FCM ile bulunan değerlerden yüksek çıktı. GAS çalışmalarında nükleusun kesilerek üstüste gelmesi ile DNA değerlerinin dağılımı ve CV'ler artmaktadır. Bu nedenle PI yüzde-leri normalden yüksek bulunabilir. Bu prob-lem daha fazla sayıda hücrenin seçilerek ça-lışılması ile ortadan kaldırılabilir. Bizim ça-lışmamızda da GAS yönteminde CV'ler FCM yöntemine göre daha yüksekti.

Yaptığımız çalışmada diffüz astrositoma va-kalarının FCM ve/veya GAS yöntemi ile DNA indekslerinin ölçülmesinin, gradeleri birbirinden ayırmada kullanılamayacağını tespit ettik. Bu da spesifik moleküler anoma-lilerin tümör yapısını, sayısal anomalilerden daha çok değiştirdiğini göstermektedir. Bu çalışmada incelenen proliferatif hücre fraksi-yonun her iki metodla farklı bulunmasına yol açan nedenlerden birisinin de diffüz ast-rositoma olgularının heterojenitesinin oldu-ğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ahyai A: Flow cytometric analysis of cellular DNA content in human astrocytomas and oligodendriogliomas. *Neursurg Rev*, 1988; 11: 177.
2. Appley AJ, Fitzgilobans PL, Chandrasoma PT, Hinton DR, Apuzzo MU: Multiparameter flow cytometric analysis of neoplasm of the central nervous system: Correlati-on of nuclear antigen P10 and DNA content with clinical behaviour. *Neurosurg*, 1990; 27: 83.
3. Becker RL, Michel UV: Interrelation of formalin fixa-tion, chromatin compactness and DNA values as mea-sured by flow and image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol*, 1990; 12: 333.
4. Bigner ST, Bijenkvig R, Laerum OD: DNA content and chromosomal composition of malignant human gliomas. *Neur Clin*, 3: 769 (1985).
5. Bookwalter JW, Selker KG, Schiffer L: Brain tumor cell kinetics correlated with survival. *J Neurosurg*, 1986; 65: 795.
6. Byar DP, Green SB, Strike TA: Prognostic factors for malignant glioma in oncology of the nervous system. D.Walker (editör), Martinus Nijhoff Publishers Boston, 1983; p: 379.
7. Chen TL, Luo I, Mikhail N, Raskova J, Raska KJ: Com-parison of flow and image cytometry for DNA content analysis of fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in breast carcinoma. *Cytometry*, 1995; 1522: 181.
8. Coons SW, Johnson PC: Regional heterogeneity in the DNA content of human gliomas. *Cancer*, 1993; 1572: 3052.
9. Coons SW, Johnson PC, Pearl DK: Prognostic signifi-cance of flow cytometry deoxyribonucleic acid analysis of human astrocytomas. *Neurosurg*, 1994; 35: 119.
10. Crune KR, Challa VR, Kute TE, Moody DM, Kelly DL: Relationship between flow cytometric features and clinical behaviour of meningiomas. *Neurosurg*, 23: 720 (1988).
11. Daumas-Duport C, Scheitauer BO, Fallon J, Kelly P: Grading of astrocytomas. A simple and reproducible system. *Cancer*, 1988; 62: 2152.
12. Ellison DA, Maygardan SJ, Novontny DB: Quantitative DNA analysis of fresh solid tumours by flow and image cytometric methods: a comparison using the Roche Pat-hology Workstation Image Analyzer. *Mol Pathol*, 1995; 8: 275.
13. Hatscheck T, Fagenberg G, Stal O: Cytometric characte-rization and clinical course of breast cancer diagnosed on a population-based screening program. *Cancer*, 1989; 64: 1074.
14. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival ma-terial for the study of aneuploidy and its clinical signifi-cance. *Cytometry*, 1985; 6: 327.
15. Kros JM, van Eden CG, Vissers CJ, Mulder AH, van der Kwast TH: Prognostic relevance of DNA flow cytometry in oligodendroglioma. *Cancer*, 1992; 69: 1791.
16. Lafuente JV, Alkiza K, Garibi JM, Alvarez A, Bilbao J, Figols J, Cruz-Sanchez FF: Biologic parameters that cor-relate with the prognosis of human gliomas. *Neuropath*, 2000; 20: 176.
17. Marchevsky MA, Bartels PH: Image analysis Vol: 1, New York 1994; p:261.
18. Mastronardi L, Guiducci A, Buttaro FM, Cristalli EG, Puzzilli F, Maria G: Relationships among DNA Index, S-Phase, and invasive behavior in anterior pituitary adeno-mas. A cytometric study of 61 cases with Feulgen-positi-ve DNA analysis. *Neurol*, 2001; 56: 27
19. Ostrowski ML, Chakraborty S, Laucirica R, Brown RW, Greenberg SD: Quantitative image analysis of MIB-1 immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assessment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol*, 1995; 17: 15.
20. Papadopoulos I, Weichert JK, Nurnberg N, Sprenger E: Quantitative DNA analysis in renal cell carcinoma. Com-parison of flow and image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol*, 1995; 17: 272.
21. Reavey JF, Haroun RI, Zahurak M, Clatterbuck RE, Par-ker RJ, Mehta R, Fruehauf JP, Brem H: The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the lite-rature. *J Neurooncol*, 2001; 55: 195.
22. Salmon I, Kiss R, Dewitte O, Gras T, Brotchi J, Durand J: Histopathological grading and DNA ploidy in relation to survival among 206 adult asrotocytic tumour patients. *Cancer*, 1992; 70: 538.
23. Salmon I, Kiss R: Relationship between proliferative ac-tivity and ploidy level in series of 530 human brain tu-mours, including astrocytomas, meningiomas, schwanno-mas and metastases. *Hum Pathol*, 1993; 24: 329.
24. Sanguenza OP, Hyder DM, White CRJ: Comparison of image analysis wih flow cytometry for DNA content analysis in pigmented lesions of the skin. *Anal Quant Cytol Histol*, 1992; 14: 55.
25. Scutte B, Reynders MMJ, Bosman FT: Flow cytometric

- determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry*, 1985; 6: 26.
26. Stendahl U, Strang P, Wagenius R, Bergstroem R, Tribukait B: Prognostic significance of proliferation in endometrial adenocarcinomas: A multivariate analysis of clinical and flow cytometric variables. *Int J Gynecol Pathol*, 1991; 10: 271.
 27. Strang P: Cytogenetic and cytometric analyses in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 1989; 8: 54.
 28. Strang P, Stendahl U, Bergstroem R, Tribukait B: Prognostic flow cytometric information in cervical squamous cell carcinoma: A multivariate analysis of 307 patients. *Gynecol Oncol*, 1991; 43: 3.
 29. Strang P, Stenkvist B, Bergstroem R, Stendahl U, Valdestel CM, Tribukait B: Flow cytometry and interactive image cytometry in endometrial carcinoma: A comparative and prognostic study. *Anticancer Res*, 1991; 11: 783.
 30. Susnik B, Poskin N, Phillips D, Le Riche J, Palcir B: Comparison of DNA measurement performed by flow and image cytometry of embedded breast tissue sections. *Anal Quant Cytol Histol*, 1995; 17: 163.
 31. Vavruch L, Enestrom S, Carstensen J, Nadenshgoig B, Wingren S: DNA index and S-phase in primary brain tumors. *J Neurosurg*, 1994; 80: 85.
 32. Yasur M, Tomita T, Engelhappd H, Gonzalescrussi F, Melone DG: Prognostic importance of DNA ploidy in medullablastoma of childhood. *J Neurosurg*, 1989; 70: 385.
 33. Zaprinov Z, Christav K: Histologic grading, DNA content, cell proliferation and survive of patients with astroglial tumours. *Cytometry*, 1988; 9: 380.