

Flow Sitometri ile DNA İçerik ve Proliferasyon Aktivitesi Ölçümlerinin Prognostik Faktör Olarak Onkoloji Alanında Uygulanması

Dr. Abdullah Aydın*

Flow Sitometri bir çok hücre sel özelliği, kısa bir zamanda, objektif olarak ölçmeye izin veren bir tekniktir. Onkoloji alanında Flow Sitometri diagnostik ve prognostik öneme sahiptir. Flow Sitometri ile DNA içerik ve proliferasyon aktivitesi ölçümleri yapmak oldukça kolaydır. Genel olarak anöploid hücre popülasyonları veya yüksek proliferasyon komponentli (S+G2M) diploid hücre popülasyonları malign olguların çoğunda kötü prognozla korelasyon göstermektedir. Bu çalışmada değişik kanser tiplerinde DNA içeriği ve proliferasyon aktiviteleri ve prognoz arasındaki ilişki yeniden gözden geçirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Flow Sitometri, DNA içeriği, proliferasyon indeksi, prognoz, kanser

The application of DNA content and proliferation activity measurements with flow cytometry as prognostic factor in oncology field

Flow Cytometry (FC) is a technique that gives permission to measure several cellular features in a short time. FC has diagnostic and prognostic importance in oncology field. The measurement DNA content and proliferation activity is very easy with FC. In general aneuploid cell populations as well as diploid cell populations with a high proliferative component (S+ G2M) correlate with a more adverse prognosis in a number of malignancies. In this study the relationship between DNA content proliferation activity and prognosis on different cancer types are reviewed.

Key words: Flow cytometry, DNA content , proliferative index, human cancer

Tümör hücrelerinin boyanması ve bunların ışık mikroskopunda değerlendirilmesi geçen yüzyılda geliştirilmiş olup halen yaygın biçimde rutinde kullanılmaktadır. Solid tümörlerde tanı doğruluğu oldukça yüksek olan bu rutin metodun prognozu belirlemedeki rolü sınırlıdır. Her ne kadar hastalığın ilerlemesiyle histolojik ve nükleer grade'in yükselmesi arasında pozitif korelasyon varsada ilave diagnostik ve prognostik belirleyicilere ihtiyaç duyulmaktadır. FC yardımıyla hücre çapı, sitoplazmik granülarite, nükleus çapı gibi hücre sel özellikleri değerlendirmek oldukça kolaydır. Hücredeki total DNA, RNA, protein içeriği ve mitokondri kitlesini ölçmek saniyeler

içinde olmaktadır. Bu metod enzim aktivitesi, hücre içi ilaç konsantrasyonu, lizozomal aktivite gibi fonksiyonel ölçümlere izin vermektedir. İmmünolojik metodları uygulanarak; doku, tür veya diferansiyasyona özgü, hücre yüzeyindeki veya içindeki antijenleri göstermek mümkündür(1). FC her ne kadar tıbbın çoğu branşlarında uygulanıyorsa da, asıl kullanıldığı alan onkolojidir. Solid tümörlerde daha çok prognozu belirlemeye yönelik DNA içeriği ve proliferasyon aktivitesi ölçümleri yapılırken, hematolojik malignitelerde diagnostik amaçla yüzey membran antijen analizi (immünfenotiplendirme) ön plandadır(2).

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ab.D., Malatya

Temel Prensipler

FC aygıtı: a) akışkan sistemi b) ışık kaynağı (lazer) c) fotodedektörler d) elektronik konvertörler e) sinyalleri anlamlı histogramlara dönüştürülen bilgisayar'dan oluşmaktadır.

Nükleus Süspansiyonu Hazırlanması

DNA analizi yapılabilmesi için birbirinden ayrılmış, nükleus süspansiyonu hazırlanması gerekmektedir. Taze tümör dokusundan nükleus süspansiyonu hazırlanması için mekanik, enzimatik veya kimyasal metodları içeren bir çok yöntem geliştirilmiştir(3). Hedley ve arkadaşlarının parafine gömülü materyallerden nükleus süspansiyonu hazırlamayı tanıtımlarıyla birlikte, arşiv materyallerinde FC'de incelenmesine başlanmış ve bazı modifikasyonları tekniği daha uygun hale getirmiştir(4,5).

DNA Analizi için Hücrelerin Boyanması

DNA'nın boyanması "intercalating" veya "nonintercalating" florokrom boyalarla yapılmaktadır. Propidium Iodide (PI) ve Ethidium Bromide (EB) gibi intercalating florokromlar, DNA'nın çifte sarmal yapısı arasına girer, çift halde bulunan temel parçacıklar arasına sokularak bunlarla birleşir. Bu boyalar aynı zamanda çift-sarmal RNA'yı da boyadığı için ribonükleaz kullanılarak RNA'nın kaldırılması ve boyaların nükleusa ulaşabilmesi için hücre membranının bir deterjanla permeabilize edilmesi gerekmektedir..

Nonintercalating boyalar ise DNA'daki Adenin-Timin yada Guanin-Sitozin'e spesifik boyalardır. Örneğin:Hoechst (33342-33258) boyaları Adenin-Timin'i boyalar.

Acridine Orange ise tek sarmal RNA'yı ve çift sarmal DNA'yı aynı anda boyayabilir.

Akışkan Sistemi. Tek hücre süspansiyonu halindeki hücreler dar bir tüpten tek sıra halinde izotonik kılıf sıvısı içinde akarlar ve ışık kaynağı önünden geçerler.

Işık Kaynağı: Yüksek yoğunlukta, tek renkli, tek düzlemde giden ve saçınıcı olmayan ışın elde edildiği için lazer'ler tercih edilmektedir.

Fotodedektörler: Işın bir florokromla boyanmış nükleus üzerine düştüğünde DNA ile

orantılı floresan ışın oluşur ve bu ışın fotodedektörlerde toplanır.

Elektronik Konvertörler ve Bilgisayar: Fotodedektörlere gelen her ışın elektrik sinyali oluşturur. Konvertörler bu sinyalleri lineer veya logaritmik olarak amplifiye ederler. Bilgisayar bu sinyalleri yorumlanabilecek, klinik anlamı olabilecek parametre listelerine ve histogramlara dönüştürür.

DNA İçerik Analizi: Floresan veren nükleik asid boyaları yardımıyla hücredeki DNA'nın ölçümü ve siklustaki hücre popülasyonunun oranını hesaplamak son derece kolaydır. GO (gap 0), G1,S (sentez), G2 (Post sentez) ve M (mitoz) G0 ve G1 fazlarındaki hücreler normal DNA içerirler (2C). S fazına giren hücre DNA sentez etmeye başlamıştır. G2 fazında hücre iki kat DNA içermektedir. M fazında hücre ikiye bölünerek siklusu tamamlar. Normal miktarda DNA içeren hücreler diploid, anormal artmış veya azalmış DNA içeren hücreler anöploid olarak isimlendirilir.

FC'de hücrelerin DNA içeriği, normal hücrelerin DNA içeriğine göre hesaplanır. Eğer incelenen hücreler normal DNA değerine sahipse yani diploid iseler DNA indeksi (DI) 1'dir. Bu değerden sapmalar anöploid hücrelerin varlığını gösterir.(6) S fazındaki ve G2M fazındaki hücrelerin yüksek oranda olması incelenen dokunun proliferasyonunu göstermektedir. Anöploid DNA değerine sahip veya proliferasyon aktivitesi yüksek tümörlerin genel olarak kötü prognoza sahip oldukları bilinmektedir (7-13).

Tümörlerde DNA içeriği ve proliferasyon aktivitesi ölçümlerinin önemi

Stage'i yüksek over karsinomlarında anöploid olgular %69- %80 iken, erken evrelerde bu oran %20-50 gibi düşük bulunmuştur. Benign ve borderline epitelial tümörler anöploidi göstermemektedir.(14) Anöploidi ve yüksek S faz, ilerlemiş FIGO stage'i, tümör büyüklüğü , residüel tümör kitlesi, düşük progesteron reseptör içeriği ve yüksek histolojik grade ile uyumlu gözükmemektedir.(15) Bir çalışmada indifferansiye over kanserlerinde anöploidi %75 iken, müsinöz kanserlerde bu oran % 39 bulunmuştur, S fazı ölçümlerinde de aynı korelasyon görülmektedir(16). Korpus Uteri kanserlerinde ploidi

majör bağımsız prognostik faktör olarak bulunmuştur(15). Stage I ve II endometrial karsinomlarda S faz fonksiyonu ve myometrial invazyon prognostik faktör olarak görülürken, S fazı aynı zamanda rekürrens zamanı ile korelasyon göstermektedir(17). Bir çok araştırmacı DNA içerik analizinin over karsinomlarında prognozu belirlemede önemli olduğunu vurgulamaktadırlar(18-20).

DNA içerik ölçümü, parsiyel mol ile komplet mol'un ayırıcı tanısında da kullanılabilir. Bir çalışmada hidropik abortus ve komplet mol diploid iken, 24 parsiyel molün 8'inde triploidi bulunmuştur(22).

Prostat karsinomlarında anöploid hücre oranı %45- %70 arasında bulunmaktadır(7). Diploid DNA'ya sahip tümörler iyi prognoza sahiptir(8). S fazındaki hücre oranı stage yükseldikçe artmaktadır(11). Gleason gradelemesi ile yapılan çalışmalarda, anöploidi, grade yükseldikçe artma göstermektedir(12). Klasik histopatolojik bulgularla birlikte DNA içerik analizi, tümör agresivliğini değerlendirmede faydalı olmaktadır.

Böbrek hücreli karsinomlarda DNA analizi tümörün biyolojik karakterini ortaya koymada araştırmacılara ışık tutmaktadır. Diploid DNA içeren tümörler, anöploid DNA içerenlerden daha iyi prognoza sahiptir. Ploidi, histolojik grade ve tümör stage' i korelasyon göstermektedir(23).

Grade I **mesane kanserlerinin** çoğu diploid karakterde iken, grade III kanserlerin çoğu anöploid karakterdedir. Grade II olgularda diploidi anöploidi oranı yarı yarıyadır(8). Mesane yıkama ve idrar materyallerinin FC ölçümleri, rekürrens ve tedaviye cevabı göstermesi açısından hasta takibinde kullanılabilir(24)

Bir çalışmada invaziv duktal **meme kanserlerinde** ploidi; nükleer pleomorfizm, mitoz,grade ile korelasyon gösterirken, tübül formasyonu ile göstermemektedir. Anöploidi grade I'de %40, grade II'de %71, III'de ise %83 oranında bulunmuştur(25). Bir başka çalışmada bunlara ilaveten S fazının yüksek olması meme kanserlerinde prognostik kriter olarak bulunmuştur(26). Histopatolojik inceleme ile biyolojik davranışının ne olacağı tam kestirilemeyen meme sistosarkoma fillodes'te ploidi, S fazının yüksek oluşu, mitozun yüksekliği ve tümör sınırlarının biçimi kötü prognozu

göstermektedir(27). Diploid ve nondiploid meme karsinomları karşılaştırıldığında, nondiploid tümör hücrelerinin kemoterapiye daha sensitif olduğu gözükmetedir(28). Başka bir çalışmada; DNA ploidi, histopatolojik grade ve hormon reseptör durumu, meme kanserlerinde sitotoksik kemoterapi'ye cevabı göstermezken, S fazının %10'dan yüksek olduğu tümörlerde regresyon gözlenmiştir(29). Diğer taraftan diploid meme tümörleri second-line hormon tedavisine daha iyi yanıt vermektedirler(30).

Hızlı ve objektif bir metod olan **FC kemik tümörlerinde** de uygulandığında, benign ve düşük grade'li malign kemik tümörlerinde diploidi, yüksek gradeli kemik tümörlerinde anöploidi'yi ortaya koymaktadır. Anöploidi ve proliferasyon aktivitesini gösteren S faz ve G2M fazının yüksekliği, malign ve benign tümörlerde istatistiki olarak farklılık göstermektedir.(31-33)

Özefagus kanserlerinde anöploidi oranı yüksek bulunmuş fakat bu durumun prognostik önemi bulunamamıştır(34). Anöploidi **gastrik kanserlerde** makroskopik ülseratif görünüm, tümör lokalizasyonu, histolojik grade ve ilerlemiş stage ile sıkı ilişki gösterdiğini belirten çalışmalar yanısıra, multiploidinin erken mide kanserlerinde olmadığı, ilerlemiş mide kanserlerinde olduğunu belirten çalışmalara rağmen kesin bir yargıya ulaşmak için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır(35,36) . Mide düz kas tümörleriyle ilgili çok az çalışma olmakla birlikte, benign tümörlerde ve düşük gradeli leiomyosarkomlarda diploidi, yüksek gradeli olanlarda ise anöploidi daha fazla gözükmetedir(37).

Kolorektal karsinomlarda flow sitometrik DNA analizi yapıldığında %45-%70 arasında anöploidi görülmektedir. Çok net olmamakla birlikte ploidi paterni prognoz hakkında bilgi vermektedir(7,8,38).

Düşük gradeli **astrositomlar** diploid karakterde bulunurken, yüksek grade'li astrositomlar ve glioblastomlar'da anöploidi oranı yükselmektedir. Bir çalışmada bu oran %21 bulunmuştur. Ayrıca S+G2M fazı (proliferasyon aktivitesi) benzer şekilde malignitenin şiddeti ile orantılı olarak artmaktadır(39).

Akciğer kanserleri kötü prognozlu, yüksek maligniteye sahip ve büyük oranda anöploid karakterli tümörlerdir. Prognozla DNA ploidi

ilişkisi zayıftır. Karşılaştırmalı bir çalışmada epitelioid plevral mezoteliomaların %78'inde diploidi, adenokarsinomlarda ise anöploidi %88 oranında bulunmuştur. Bu farklılık bu iki tümörün biyolojik davranışı, hastalığın progresyonu ve tedaviye cevap konularında ışık tutabilir (40). **Yumuşak doku tümörlerinde** yapılan çalışmalarda DNA içeriği ve proliferasyon indeksinin prognozla ilişkisi konusunda çelişkili sonuçlar alınmıştır(41). Anöploidin erişkin lösemilerinde önemi açık değil iken, pediatrik akut lenfoblastik lösemili hastalarda D1'i 1.15 den yüksek olan hastalarda relaps göstermeyen sürvi, normal diploidi gösteren hastalara göre uzun bulunmuştur(42) Non-Hodgkin lenfomalı hastalarda D1'dan çok, proliferasyon durumu önemlidir. Grade ile S fazı arasında kuvvetli korelasyon görülmektedir (43,44) Mikozis Fungoidesli hastalarda anöploidi, multipl myelomalı hastalarda hipodiploidi veya multiploidi kötü prognozu göstermektedir(45,46). Ayrıca Multipl myelom'lu hastalarda anöploidi yüzdesinde azalma tedaviye cevabı, önceleri diploid iken anöploidinin ortaya çıkışı ise rölapsı gösterir(47).

Sonuç: FC kısa sürede bir çok hücrenin farklı karakterlerini objektif olarak ölçmeye izin veren son 10-15 yılda rutine giren, özellikle onkolojide geniş kullanım alanı olan bir tekniktir. FC yardımıyla DNA içerik ve proliferasyon aktivitesi ölçümleri, klasik klinikopatolojik prognostik belirleyiciler gibi, çoğu tümör de güvenilir bir belirleyici olma yolundadır. Bu teknik hematolojik malignitelere diagnostik olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda kemoterapi veya radyoterapiye uygun hastaların seçiminde ve tedaviye yanıtı takipte de uygulama alanı bulmaya başlamıştır. İncelenen hücrelerin görülememesi dezavantaj gibi görülsede çalışılan materyalden hazırlanacak sitospin preparatlar bu eksikliği giderir. FC'de elde edilecek bulguların diğer klinik ve laboratuvar bulgularla birlikte yorumlanması akıldan çıkarılmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Andrzej M. Perspectives. In: Viehl P, editor. Guides to Clinical Aspiration Biopsy, Flow Cytometry. Igaku-Shoin, New York. 1991.
2. Yang OH, Louise H. Oncology applications of flow cytometry. Clin Lab Sci 1992;5:25-7.
3. Vindelov LL, Chirstensen IT. A review of techniques and results obtained in the laboratory by integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. Cytometry 1990; 11: 753-70.
4. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 1985;6:327-33.
5. McLemore DD, El-Naggar AK, Stephens LC, Jardine JH. Modified methodology to improve flow cytometric DNA histograms from paraffin- embedded material. Stain Technology 1990;65:279-91.
6. Hiddeman W, Schumann J, Andreef M, Barlogie B, Herman JC, Leif RC, et al. Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 1984;5:445-6
7. El-Naggar AK. Clinical relevance of the flow cytometric analysis in cancer. The Cancer Journal 1992;5: 321-7
8. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Werssto RP. Flow Cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors. Human Pathology 1989; 20: 528-48.
9. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow Cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. J Clin Oncol 1987;5:1690-703.
10. Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. Path Res Pract 1990; 186: 37-62.
11. Frankfurt OS, Greco WR, Slocum HK, Arbuck SG, Gamarra M, Pavelic ZP, Rustum YM. Proliferative characteristics of primary and metastatic human solid tumors by DNA Flow Cytometry. Cytometry 1984; 5:629-35.
12. Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O. DNA content in human cancer. Arch Pathol Lab Med 1989;113:619-26.
13. Williams NN, Daly JM. Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. Surgery; Gynecology and Obstetrics 1990; 171:257-66.
14. Dressler Lg, Bartow SA. DNA Flow Cytometry in solid tumors: Practical aspects and clinical applications. Seminars in Diagnostic Pathology. 1989;6:55-82.
15. Van Dam PA, Watson JV, Lowe DG, Shepherd JH. Flow Cytometric DNA analysis in gynecological pathology. Int J Gynecol Cancer. 1992;2:57-65.
16. Kallioniemi OP, Mattila J, Punnonen R, Koivula T. DNA poidy level and cell cycle distribution in ovarian cancer: Relation to histopathological feature of the tumor. Int J Gynecol Pathol. 1988; 7:1-11.
17. Wagenius G, Bergström R, Strang P, Gerdes U, Rogo K, Tribukait B, Stendahl V. Prognostic significance of flow cytometric and clinical variables in endometrial adenocarcinoma stages I and II. Anticancer Research. 1992;12: 725-32.

18. Coon JS Landay AL, Weinstein RS Biology of disease, advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Laboratory investigation. 1987;57:453-73
19. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. Cancer 1990;65:1194-205.
20. Ryan DH, Follan MA, Horan PK. Flow cytometry in the clinical laboratory. Clinica Chimica Acta 1988;171:125-74.
21. Sasaki K, Murakami T. Clinical application of flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. Acta Pathol Jpn 1992;42:1-14.
22. Mangili F, Sassi I, Patetta M, Marelli G, Marabini R, Cantaboni A. Flow Cytometric diagnosis of parical mole. Path Res Parct 1992;188:425-27.
23. El-Naggar AK, Batsakis JG Teague K, Giacco G, Guinee VF, Swanson D. Acridine Orange Flow Cytometric analysis of renal cell carcinoma. Am J Pathol 1990; 137:275-80.
24. Melamed MR. Flow cytometry for dedection and evaluation of urinary bladder carcinoma. Semin in Surg Oncol. 1992;8:300-7.
25. Frierson HF. Grade and Flow Cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. Hum Pathol. 1993;24:24-29.
26. Lipponen P, Papinaho S, Eskelinen M, et al. DNA ploidy, S phase fraction and mitotic indices as prognostic predictors of female breast cancer. Anticancer Research 1992;12: 1533-38.
27. El-Naggar AK, RO JY, Mclmore D, Garnsy L. DNA content and proliferative activity of cystosarcoma phyllodes of Breast. Am J Clin Pathol 1990: 93; 480-85.
28. Briffod M, Syratos F, Tubiana-Hulin M, et al. Sequential cytopunctures during preoperative chemotherapy for primary breast carcimoma. Cancer 1989;63:631-37.
29. Remvikos Y, Beuzebac P, Zajdela A, et al. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 1989; 81:1383-87.
30. Seymour L, Bezuoda WR, Meyer K. Response to second-line hormone treatment for advanced breast cancer. Cancer 1990;65:2570-724.
31. Heliö H, Karaharju E, Nordling S. Flow Cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumors. Cytometry 1985;6:165-71.
32. Kreicbergs A, Silfversward C, Tribukait B. Flow DNA analysis of primary bone tumors. Cancer 1984: 53; 129-36.
33. Mankin HJ, Connor JF, Schiller AI, et al. Grading of bone tumors by analysis of nuclear DNA content using flow Cytometry. The Journal of Bone and Joint Surgery 1985;67:404-13.
34. Robey-Cefferty SS, El-Naggar AK, Şahin AA, et al. Prognostic factors in esophageal squamous carcinoma. Am J Clin Pathol. 1991;95:844-49.
35. Tsushima K, Nagorney DM, Reiman HM. Correlation of DNA ploidy, histopathology, stage and clinical outcome in gastric carcinoma. Surgical Oncology 1992;1:17-25.
36. Umehara Y, Kimura T, Yoshida M, et al. Heterogeneity in early and advanced gastric carcinoma by flow cytometric DNA analysis. Journal of Surgical Oncology. 1993;52:97-100
37. Shimamoto T, Haruma K, Sumii K, et al. Flow Cytometric DNA analysis of gastric smooth muscle tumors. Cancer 1992;70:2031-4.
38. Tsuchiya A, Ando Y, Ishii Y, et al. Flow Cytometric DNA analysis in Japanese colorectal cancer, multivariate analysis. European Journal of Surgical Oncology. 1992;18:585-90.
39. Fitzgibbons PL, Turner RR, Appley AJ, et al. Flow Cytometric DNA and nuclear antigen content in astrocytic neoplasms. Am J Clin Pathol. 1988;89:640-4.
40. El-Naggar AK, Ordenez NG, Gainsey L, et al. Epitheloid pleural mesotheliomas and pulmonary adenocarcinomas. Hum Pathol 1991;22:972-8.
41. El-Naggar AK. DNA Flow Cytometric analysis in the Assessment of soft-tissue neoplasms. The Cancer Bull. 1993;45:24-28.
42. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow Cytometry, cellular DNA content and prognosis in human malignancy. Journal of Clinical Oncology. 1987; 5:1690-703.
43. Diamond LW, Nathwani BN, Rappaport H. Flow Cytometry in the diagnosis and classification of malignant lymphoma and leukemia. Cancer 1982;50:1122-35.
44. Braylan RC, Flow Cytometric DNA analysis in the diagnosis and prognosis of lymphoma. Am J Clin Pathol 1993;99:374-80.
45. Clark R, Peters S, Hay T, et al. Prognostic importance of hypodiploid hemopoietic precursors in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 1986;314:1472-75.
46. Walle AJ, Niedemayer W. Aneuploidy as a marker of minimal residual disease in leukemia. Cancer Dedection and Prevention 1985;8:303-15.
47. Barlogie B, McLaughlin P, Alexanian R. Characterization of hematologic malignancies by flow cytometry. Anal and Quant Cytol and Histol. 1987;9:147-55.

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Aydın
İnönü Üniversitesi Tıp fakültesi
Patoloji Ab.D.
Malatya