

Kıkırdak tümörlerinde hücresel DNA içeriği ile klinikopatolojik özelliklerin karşılaştırılması

Sergülen Dervişoğlu⁽¹⁾, Aslı Kasabalgil⁽²⁾, Altan Yalçiner⁽³⁾, Büge Öz⁽⁴⁾, Süha Göksel⁽⁵⁾, Murat Hız⁽⁶⁾, Ajlan Kasabalgil⁽⁷⁾, Günay Girişken⁽⁸⁾

Düşük grade'li kondrosarkomların encondromlarla ayırıcı tanısı, üzerinde tartışmaların halen sürdüğü bir konudur. Bu konuya çeşitli klinik, radyolojik ve histopatolojik yaklaşımlar getirilmektedir. Çalışmamızda 5'i encondrom, 5'i Grade I kondrosarkom, 4'ü Grade II kondrosarkom, 5'i Grade III kondrosarkom, 4'ü mezenkimal kondrosarkom olmak üzere 23 kıkırdak tümörüne ait parafin bloklardan elde edilen kesitlere kollagenaz işlemi sonrası flow sitometrik analiz yapıldı. Hücresel DNA içeriği yanısıra presentetik büyüme fazı, sentetik faz, postsentetik faz, mitotik büyüme fazları her vaka için değerlendirildi. Bulgular klinikopatolojik özelliklerle birlikte değerlendirildiğinde DNA ploidi ve proliferasyon fazı değerlerinin ayırıcı tanıya ışık tutan kriterler olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Hücresel DNA içeriği, kıkırdak tümörleri, flow sitometrik analiz.

Cellular DNA content and clinicopathologic correlations in chondroid tumors

The process of differentiating between cartilage tumors is complex. Flow cytometric DNA analysis was performed on 23 chondroid tumors out of which 5 were enchondroma, 5 were Grade I, 4 were Grade II, 5 were Grade III and 4 were mesenchymal chondrosarcoma. Cellular DNA content, presynthetic growth phase, synthetic phase, postsynthetic phase and mitotic growth phases were determined for each case. Flow cytometry appears to provide a useful method to describe the DNA ploidy in cartilage tumors. In addition to nuclear DNA changes, proliferation phase values may also help in differential diagnosis of these tumors.

Key words: Flow cytometry, DNA content, cartilage tumors

Düşük gradeli kondrosarkomların encondromlarla ayırıcı tanısı üzerinde tartışmalar sürmektedir. Malign hücrelerin gösterdiği kromozomal değişiklikler ve bunların hücre nükleuslarının kantitatif sitomorfometrik incelenmesiyle ölçümleri son 10 yıl içinde üzerinde durulan bir konudur (3,4, 6,10).

Aktif replikasyonda olmayan hücreler DNA biriktirmeyi için G_0 fazındadır ve diploid DNA içerirler. Hücreler bölünme öncesi dönemde (G_1 fazı) replikatif ünitesini değiştirerek sentez fazında (S fazı) DNA içeriklerini artırır ve premitotik döneme (G_2 fazı) geçerler. Bu dönemde hücreler tetraploid miktarda DNA içerirler. Sonra mitotik bölünme fazı (M fazı) gelir. Diploid konsantrasyonda DNA içeren G_1G_0 fazındaki hücreler, DNA sentez eden S fazındaki hücreler ve tetraploid hücrelerin saptanması bir dokudaki hücresel siklusun hızını gösteren iyi bir göstere olabilir. Neoplastik bir populasyonda görülen anormal DNA içeriği ise anaploidi olarak adlandırılır ve DNA yapısındaki aberan bir hücre klonunu gösterir. Anaploidinin pleomorfik ya da anaplastik hücrelerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir (1,6). Diğer bazı tümörlerde olduğu gibi kıkırdak tümörlerinde de euploid tümörlerin diğerlerine oranla daha iyi prognoza sahip oldukları bilinmektedir (1, 2, 5, 7, 8, 9).

Gereç yöntemi

Çalışmamızda 1980-1991 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan 5'i encondrom, 5'i Grade I, 4'ü Grade II, 5'i Grade III, 4'ü mezenkimal kondrosarkom olmak üzere 23 kıkırdak tümörü değerlendirilmeye alındı. Beraberinde 3 otopsi olgusundan elde edilen normal kıkırdak dokuları da incelendi. Ortalama yaş 35 olup, hastaların %53'ü kadın, %47'si erkekti. Tüm vakalara ait parafin bloklardan 40 mikronluk 4'er kesit yapıldı. Son kesitten sonra elde edilen 5 mikronluk birer kesit Hematoksilin-Eosinle boyanarak histo-patolojik değerlendirmeye alındı. Parafinli kesitler 2 kez ksilol, birer kez %95, %80, %60 ve %50'lik alkollerden geçirildi. Tamponlanmış NaCl solüsyonunda 1 gün bekletildikten sonra 14 numara iğne ile parçalandı. %0.1' kollagenaz (Sigma C-7926) solüsyonunda 1 gün bekletildi. 20 ve 26 numara iğnelere geçirildikten sonra elde edilen hücre süspansiyonu büyük parçaların ve hücre kümelerinin ayrımı amacıyla 27 mikronluk naylon mesh'den filtre edildi. Propidium iodide ile boyanarak Becton-Dickenson Facscan Flow Cytometer ile analizi yapıldı. Elde edilen veriler Cellfit Software programı ile değerlendirildi. Bazı tümörlerde yeni kesitler alınarak işlemler tekrarlandı. Sonuçlar SPSS Coftware programında t testi ile değerlendirildi.

(1) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Yard. Doç. Dr.

(2) SB Süleymaniye Doğum ve Kadın Hast. Hastanesi Patoloji Uzmanı

(3) Düzen Laboratuvarlar grubu, Biokimya Uzmanı

(4) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Yard. Doç. Dr.

(5) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Yard. Doç. Dr.

(6) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(7) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(8) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.

Bulgular

Kıkırdak dokusuna kollagenaz işlemi uygulanması nedeniyle bazı problemlerin ortaya çıktığı görüldü. Parçalanmadaki yetersizlik nedeniyle büyük partiküllerin fazla olduğu vakada, işlemde tekrarlamalara rağmen yüksek varyasyon katsayısı değerleri ortaya çıktığından 7 vaka araştırmadan çıkarıldı.

Çalışmamızda ilk dikkatimizi çeken özellik kıkırdak dokusunun ara maddeden zengin, hücreden nispeten fakir bir doku olması nedeniyle yeterli hücre sayısını elde etmede ortaya çıkan güçlük oldu. bu nedenle bazı tümörlerde ancak daha çok sayıda kesit yapılarak yeterli hücre sağlandı. Vakalara ait flow cytometric analiz sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

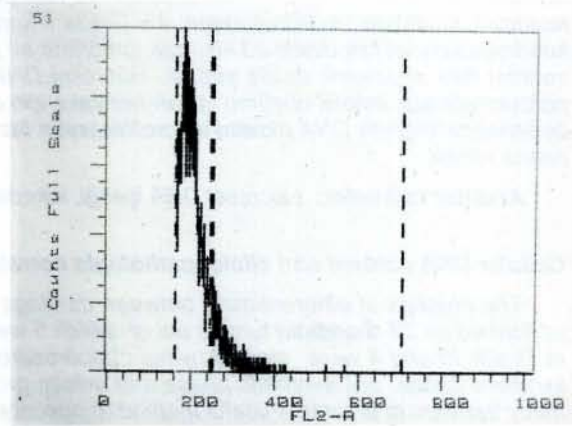
GRADE	G ₀ G ₁ fazı	S fazı	Anaploid	DNA indeksi	CV
EK	86.6	13.2	0	1.0	9.9
EK	93.1	6.0	0	1.0	10.3
KS I	78.3	14.8	0	1.0	10.6
KS I	85.6	12.5	0	1.0	10.1
KS I	85.9	13.8	0	1.0	10.3
KS II	88.4	10.8	0	1.0	9.1
KS II	77.2	22.2	1	1.2	9.2
KS II	88.9	10.8	0	1.0	8.5
KS III	66.6	31.7	1	1.2	15.3
KS III	66.3	33.6	2	1.9	13.7
KS III	56.2	41.9	1	1.1	7.0
KS III	55.0	44.9	1	1.1	9.7
KS III	66.0	33.0	1	1.2	8.8
MEZ KS	58.1	40.8	1	1.2	13.8
MEZ KS	61.8	32.9	1	1.2	10.1
MEZ KS	78.6	20.9	1	1.8	11.2
MEZ KS	48.9	42.0	1	1.4	14.1

Tablo 1: Kıkırdak tümörlerinde flow sitometrik analiz

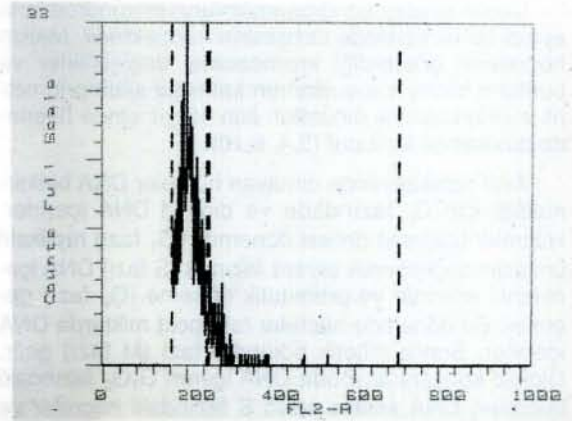
EK: Enkondrom
 KS I: Grade I Kondrosarkom
 KS II: Grade II Kondrosarkom
 KS III: Grade III Kondrosarkom
 MEZ KS: Mezenkimal Kondrosarkom
 G₀G₁ fazı: Presentetik büyüme fazındaki hücrelerin oranı
 S fazı: Sentetik fazdaki hücrelerin oranı
 Anaploid: Histogramda anaploid (anormal DNA içeren hücre) pik sayısı
 DNA İndeksi: Hüresel DNA içeriğini belirten indeks
 CV: Coefficient of variation: Varyasyon katsayısı (Normalize edilmiş standart deviasyon)

Vakalarda artan gradelerin artan anaploidi düzeyleriyle paralel gittiği, G₀G₁ fazındaki hücre oranının grade ile ters orantılı olduğu (p<0.05), S fazı fonksiyondaki hücre oranının Grade arttıkça yükseldiği (p<0.01) görüldü. Vakalarımızda DNA indeksleri grade arttıkça artmakla birlikte istatistiksel olarak bunun anlamının sınırlı olduğu dikkati çekti (p=0.05). Enkondrom ve Grade I kondrosarkomlarda flow cytometric histogramda dar bir diploid pik ve az sayıda S fazı hücresi görüldü (Şekil 1,2). Enkondrom ve Grade I kondrosarkomlarda anaploidi bulunmadığını, vakalar anaploid ve diploid olarak ayrıldığında, anaploid vakalarda G₀G₁ fazındaki hücre sayısının belirgin olarak azaldığı izlendi (p<0.01). Anaploidisi olan vakalardan Grade III ve bir mezenkimal kondrosarkomun histogramları Şekil 3 ve 4'te görülmektedir. Grade III vakada yakın diploid geniş bir anaploid hücre çizgisi ile S fazındaki hücrelerde artış ve bir miktar tetraploid hücre vardır (Şekil 3). Mezenkimal kondrosarkomlarda ise histogramda anaploidi ve belirgin tetraploid hücre piki elde edildi (Şekil4). Bu tümörlerde prolifere-

rasyon fazındaki hücrelerde belirgin artış gözlemlendi (p<0.01). Sonuçları değerlendirmeye alınan 17 kıkırdak tümöründen 11'ine ait 2 ila 5 yıllık takipler mevcuttu. Bunlardan bir mezenkimal kondrosarkom vakasının tümöre bağlı nedenlerle 1 yıl içinde eks olduğu, iki mezenkimal kondrosarkomun ise uzak metastazlarla birlikte terminal dönemde olduğu görüldü. Takibi bulunan 1 enkondrom, 1 Grade I, 3 Grade II, 3 Grade III kondrosarkom vakası komplikasyonsuz hayattaydı.



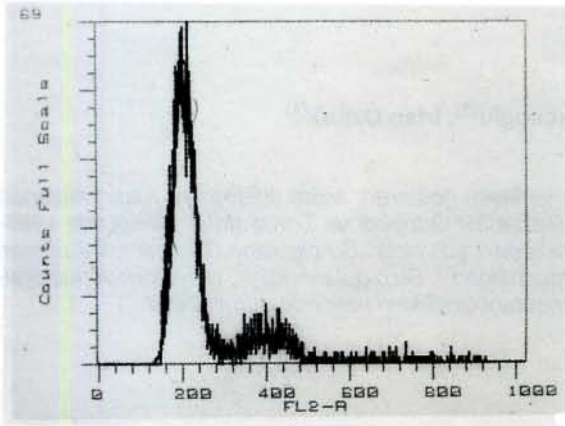
Şekil 1: DNA indeksi 1 olan enkondrom olgusuna ait histogramda dar diploid pik görülmekte



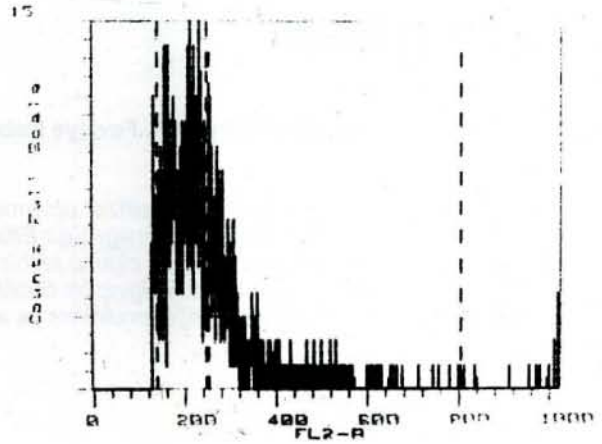
Şekil 2: Grade I kondrosarkom olgusuna ait histogram

Tartışma

Flow cytometric incelemeler ilk kez 1960 yılında Derman ve Hofer tarafından başlatılmış, bunu takibeden yıllarda bu yöntemin önce araştırmalarda, daha sonra da klinik incelemelerde kullanılmasına geçilmiştir (6). Literatür gözden geçirildiğinde kemik ve yumuşak doku tümörlerinde flow cytometric, incelemelere ait az sayıda yayın bulunduğu görülmektedir. Kıkırdak tümörlerinde ayırıcı tanıyı amaçlayan ilk yayın 1980 yılında diğer kemik tümörlerinde de incelemeleri bulunan Kreicbergs ve arkadaşları tarafından yapı-



Şekil 3: DNA indeksi 1.9 olan Grade III kondrosarkomun histogramında yakın diploid tipte geniş bir anaploid hücre piki



Şekil 4: DNA indeksi 1.8 olan mezenkimal kondrosarkom histogramında tetraploid tipte anaploidi görülmekte

miştir. Son olarak ise 1992 sonunda Boston'da yapılan bir toplantıda Mankin ve arkadaşları 108 kıkırdak tümörünü kapsayan geniş bir kemik ve yumuşak doku tümörleri araştırmasında kıkırdak tümörlerinin flow sitometride en iyi sonuçları veren grup olduğunu savunmuşlardır (1, 2, 4, 7, 8, 9).

Olgularımızda varyasyon katsayısı değerlerinin bazı vakalarda ileri derecede yüksek oluşunun kollajenaz işlemine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Literatürde kıkırdak dokusunun parafin kesitlerine uygulanan benzer bir çalışma bulunmadığından bu konuda bir karşılaştırma yapılamadı. Ancak literatürde nekrozun varyasyon katsayısını arttırdığını ileri süren bir çalışma mevcuttur (8). Çalışmamızda nekrotik alan içermeyen doku örnekleri kullanıldığından yüksek varyasyon katsayısı nekroz varlığından çok kollajenaz işlemine bağlanmıştır.

Sonuçlar gözden geçirildiğinde encondrom ve Grade I kondrosarkom vakalarında anaploidinin bulunmaması, DNA indeksinin endrom ve düşük gradeli kondrosarkomlarda yüksek değerde oluşu literatürde bildirilenlerle uyumlu özelliklerdir. Bunlara ek olarak varyasyon katsayısı değerlerinin de encondrom ve düşük gradeli kondrosarkomlarda yüksek olduğu görüldü. G0G1 fazındaki hücre oranlarının encondromlarda, grade I kondrosarkomlara göre düşük olmasına karşın, arada dikkati çeken bazı yüksek değerler iki grubun kesişmesine yol açmaktadır. Sonuç olarak bu preliner çalışma ile, daha geniş ve takipli serilerde daha anlamlı sonuçlar alınabileceği ve bu çalışmalardan elde edilen ortalama değerlerin de malign ve benign kıkırdak tümörlerinin ayırıcı tanısında prognozunu tayin etmeye yönelik kriter olarak kullanılacağı düşünüldü.

Kaynaklar

1. Alho, a., Connor, J., Mankin M.J. et al.: Assesment of malignacy of cartilage tumors, using flow cytometry. J. Bone Joint Surg. 65-A 6: 779-85, 1983.
2. Bauer, H.C. F. Kreicbergs, A.: Relationship between DNA content and histology of muskuloskeletal tumors. 3rd EMSOS Meeting, Stockholm, Abstract Book, pp: 5, 1990.
3. Becker, W.: Giant chondromas and chondrosarcomas: unexpected dignity and unusual behavior. 3rd EMSOS Meeting, Stockholm, Abstract Book, pp: 8, 1990.
4. Böhm, G., S. Kuntchik, M.: Morphometric analysis of cartilagenous tumors. 3rd EMSOS Meeting, Stockholm, Abstract Book, pp: 8, 1990.
5. Bresjö, O., Bauer, H., Nilsson, U.: Enchondroma and low grade chondrosarcoma: A clinical follow up 3rd EMSOS Meeting, Stockholm, Abstract Book, pp: 15; 1990.
6. Krebergs A., Boquist, L., Borssen, B. et al.: Prognostic factors in chondrosarcoma: A comparative study of cellular DNA content and clinicopathologic fatures. Cancer 50: 577-83y, 1982.
7. Mirra, J.M.: Intramedullary cartilage and chondroid Producing tumors. In Bone Tumors, Vol I, pp: 439-691, Lea & Febiger, Philadelphia, 1989.
8. Mirra, J.M., Gold, R., Downs, J. et al.: A new histologic approach to the diffirentiation of chondrosarcoma and chondrosarcoma of the bones: A clinicopathologic analysis of 51 cases. Clin. Orthop. 201: 214-37, 1985.
9. Schajiwcz, F., McGuire, M.H.: Diagnostisic difficulties in skeletal pathology. Clin. Orthop. 240: 281-310, 1989.
10. Welkerling, H., Gohm, T.H., Delling, G.: Distinction between enckhondromas on the base of quantatives measurements. 3rd EMSOS Meeting, Stockholm, Abstract Book, pp: 9, 1990.

Yazışma adresi

Yard. Doç Dr. Sergülen Dervişoğlu
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Kocamustafapaşa, İstanbul, Türkiye