

MEME KANSERLERİNDE DNA VE PROLİFERATİF İNDEKS

Dr. Mine HEKİMGİL (*)

Birkaç yıl öncesine kadar meme kanserli olgularda aksiller lenf nodüllerinin negatif bulunması iyi prognoz göstergesi olarak kabul edilerek, bu olgulara primer cerrahi uygulama ardından hiçbir adjuvan tıbbi tedavi önerilmemektedir. Ancak aksiller tutulumu olmayan hastalardan primer tedavi sonrasında on yıl süreyle izlenenlerin yaklaşık % 25'inde meme karsinomu rekürrensi görülmüş (1) ve bu konudaki son çalışmaların büyük bir kısmı adjuvan tedavinin gerekli olabileceği yüksek risk grubunu saptamaya yönelik prognostik belirleyicilerin tanımlanmasını amaçlamıştır.

Hücre kinetiği konusundaki incelemeler, klasik prognostik belirleyicilere (örn. tümörün boyutları ve nukleer derecesi) ek olarak önemli veriler sağlamaktadır. **Tümörün proliferatif aktivitesi** total hücre popülasyonu içinde siklustaki hücrelerin oranı olarak tanımlanmaktadır ve meme karsinomlarını da içermek üzere değişik solid tümörlerde prognostik öneme sahiptir. Bu amaçla tritiated timidin veya bromodeoksiuridin ile işaretleme, flow sitometri ve Ki-67 gibi monoklonal antikorlar kullanılarak meme kanserlerinde proliferatif fraksiyon saptanmaya çalışılmaktadır. Proliferatif aktivitenin bu yeni belirleyicileri prognoz ile belirgin ilişki göstermektedir, ancak adjuvan sağaltım için tek başlarına karar verici faktörler olarak uygulamaya girebilmeleri için sensitivite ve rekürrens için belirleyici rolleri henüz sınırlıdır ve prognozu belirlemede bugün için multifaktöriyel analizler daha güvenilir görünmektedir.

NORMAL HÜCRE SIKLUSU

Tanım olarak hücre siklusu sürekli olarak bölünen bir hücrede ardışık iki mitoz arasındaki süreci kapsar ve dört fazdan oluşur: Aktif siklusun ilk fazı G1 (gap 1)'de diploid DNA içeriği (2N) vardır. G1 ardından DNA'nın aktif olarak sentez edildiği S (sentez) fazı gelir ve bu fazdaki hücrelerin DNA içeriği 2N-4N arasındadır. DNA sentezinin tamamlanmasından sonraki faz G2 (gap 2) fazıdır ve mitozun (M fazı) başlangıcına dek sürer. G2/M fazındaki hücrelerin DNA içeriği 4N'dir. İnaktif faz G0'dur ve bu fazdan sonra terminal differansiasyon ve hücre ölümü söz konusudur.

MİTOZ SAYIMI:

Morfolojik olarak hücre proliferasyonunun tayininde geleneksel ve uygulaması en pratik yöntem mitoz sayımıdır, ancak proliferasyon tayini için kullanılan yeni yöntemler kadar hassas sonuçlar vermemektedir. Mitoz sayımı ile ölçülebilen periyod (M fazı) proliferasyondaki hücre popülasyonunun çok kısa bir dönemini kapsar ve az sayıdaki hücre grubunu yansıtır. Bu ölçümün standardize edilemeyeceği ve güvenilirliğinin sınırlı olmasına neden olan faktörler şu şekilde özetlenebilir (2):

A- Yöntem farklılıkları:

- 1- Mikroskop objektiflerinin markalarına göre farklı büyütme oranına sahip olması sonucunda sözkonusu büyük büyütme alanlarının boyutlarındaki farklar

ve

2- Mitotik oranın tanınımının:

- a- belli sayıda büyük büyütme alanındaki mitoz sayısı,
- b- milimetrekaredeki mitoz sayısı ya da
- c- sayılan tümör hücrelerinin mitozda olanlarının oranı (mitotik indeks) şeklinde değişken olması yöntemin standardizasyonunu engellemektedir.

B- Yorum ve teknik farklar: Mitotik hücrelerin doğru tanınmasında gözlemcinin deneyimi, kesitin kalınlığı vb. teknik farklılıklar, dokunun fiksasyonunda gecikme, birçok rastgele seçilen alan/mitotik olarak en aktif alanın sayımda seçimi ve örneklenen tümör alanlarının heterojenitesi gibi faktörler farklı sonuçlar alınmasına neden olmaktadır.

Yöntemin subjektifliği nedeniyle güvenilirliğinin sorgulanmasına karşın, yine de mitoz sayımı birçok morfolojik incelemede proliferasyon ölçümü için rutin olarak kullanılmakta ve meme karsinomlarını da içeren bazı tümörlerin derecelendirme sistemlerinin önemli bir komponentini oluşturmaktadır. Mitotik aktivite düşük ve yüksek riskli meme tümörlerinin ayırımında yardımcıdır, mitotik aktivitesi yüksek olan meme tümürlü olgular yüksek risk grubuna girmektedir (3).

TİMDİNLE İŞARETLEME:

Tritiated timidin (3H-TdR) işaretlemesi yönteminde, radyoaktif olarak işaretlenen bu DNA prekürsörünün hücreye girmesi, proliferasyon olan hücrelerin direkt morfolojik değerlendirilmesini sağlar. Aktif S-fazındaki hücrelerdeki DNA sentezinin direkt olarak ölçümü ile sınırlı olduğu için sadece morfolojiye dayanan mitoz sayımı ve Ki-67 ve PCNA gibi proliferasyonun daha geniş morfolojik değerlendirmesini sağlayan yöntemlerden farklıdır.

Sadece aktif olarak proliferasyon gösteren hücreler 3H-TdR'yi alabilirler, bu nedenle incelenen hücrelerin canlı olması gerekmektedir. Alınan doku taze olarak 3H-TdR ile 1-2 saat inkübe edilir ve daha sonra rutin olarak takip edilir. 3H-TdR tutulumunu arttırmak için, hiperbarik ortamda inkübasyon ve 5-florouridin veya 2-deoksi-5-florouridin uygulaması ile timidilat sentetazın bloke edilerek intrasellüler timidin trifosfat konsantrasyonunun azaltılması gereklidir (2). Aksi takdirde timidin trifosfat timidin kinazı inhibe eder. Kesitlerin otoradyogramları bir haftalık inkübasyon sonucunda hazır olur.

$$\text{Timidinle işaretleme indeksi} = \frac{\text{Toplam pozitif tümör hücresi sayısı}}{\text{Sayılan toplam tümör hücresi sayısı}} \times 100$$

Meme karsinomlarında timidin işaretleme indeksi ile proliferatif aktiviteyi inceleyen bazı araştırmacılar, timidin işaretleme indeksinin hem relaps, hem de hastalıktan ölümün belirlenmesinde önemli bir gösterge olduğunu öne sürmüşlerdir (4-6). Tubiana ve ark. (5)'nin 96'sında tanı amaçlı aksiller disseksiyon yapılan 128 olguyu kapsayan çalışmalarında 10 yıllık takip sonucunda, yüksek işaretleme indeksi gösteren olguların % 62'sinde, düşük indeksli olguların % 25'inde relaps görülmüştür. Araştırmacıların çalışmasında timidin işa-

retleme indeksi lenf nodülü tutulumu ile korelasyon göstermemiş, klinik ve patolojik evrelemeden bağımsız bir prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir. Meyer ve ark. (4), 186 olguluk çalışmalarında yaklaşık iki yıllık takip sonucunda aksiller lenf nodülü tutulumu, timidin işaretleme indeksi ve nükleer derecenin relapsı survivi bağımsız olarak etkilediğini, timidin işaretleme indeksinin tümörün histolojik özellikleri ile belirgin korelasyon gösterdiğini, ancak tümör büyüklüğü, pozitif aksiller lenf nodülü sayısı ile korelasyon göstermediğini vurgulamışlardır. Silvestrini ve ark. (6) timidin işaretleme indeksi, tümör boyutu ve lenf nodülü tutulumu arasında belirgin bir korelasyon bulamamış, timidin işaretleme indeksinin lenf nodülleri negatif olan hastalarda oldukça belirgin bir prognostik faktör olduğunu gözlemişlerdir. McDivitt ve ark. (7) tümör boyutu, tümörün östrojen reseptörü durumu ve histolojik derecesinden bağımsız olarak timidin işaretleme indeksi ile uzun süreli hastaliksız surviv arasında korelasyon saptamışlardır. Bu çalışmaların ışığında timidin işaretleme indeksi meme tümörlerinde klinik ve patolojik evrelemeden bağımsız önemli bir prognostik belirleyici olarak değerlendirilmektedir.

Morfolojik mitoz değerlendirmesinde olduğu gibi, bu metotta da pozitif hücrelerin değerlendirilmesinde gözlemciler arası farklılık, değerlendirilen hücre sayısı, proliferatif aktivite açısından tümörün heterojenitesi ve yanlış örnekleme gibi hatalı sonuçlara neden olabilecek subjektif farklılıklar vardır. Yöntemin teknik dezavantajları ise uzun inkübasyon süresi nedeniyle sonuçların geç alınması, zaman alan hücre sayımları, sadece taze dokuda çalışılabilmesi ve görüntülemeye otadyografinin gerekliliği nedeniyle radyoizotop kullanımı şeklindedir (2).

BROMODEOKSİÜRİDİN İLE İŞARETLEME:

Timidin analogu olan 5-bromodeoksiuridin (BrdU) ile tritiated timidin incelemesindeki bazı teknik gereksinimler benzerdir. İdeal sonuçlar için hiperbarik ortamda inkübasyon gereklidir ve timidilat sentetaz blokajı ile tutulum artırılabilir. Ancak BrdU incelemesinde radyoizotop ile çalışmak veya otadyografi gerekmemektedir. 1982'de Gratzner, 5-BrdU'ya spesifik monoklonal antikorları geliştirmiştir (8). Tümörün sentetik olarak aktif olan hücre popülasyonu (S-fazı) BrdU'yu tutar ve immünohistokimya, immünofloresan veya flow sitometrik yöntemler ile görüntülenebilir. Timidin işaretlemesi ve BrdU sonuçlarını karşılaştıran çalışmalarda benzer sonuçlar alınmıştır (2). İnkübasyon sırasındaki BrdU konsantrasyonu, indeksi ve işaretlemenin kalitesini belirlemede çok önemlidir. BrdU işaretlemesinde tritium gibi yarı ömrü uzun bir radyoaktif maddenin kullanımının gerekmesi klinik laboratuvarlarda daha kolay uygulanmasını sağlamaktadır. Bunun dışında BrdU işaretlemesindeki teknik dezavantajlar timidin işaretlemesine benzer, ancak immünovisualizasyon veya flow sitometrideki kalitatif değişkenler ek tartışmaları oluşturur.

Galgia ve ark. (9) tarafından 376 meme tümöründe yapılan son bir çalışmada BrdU skoru ile hastaliksız surviv arasında belirgin ilişki saptanmış, ortalamanın altında BrdU skoruna sahip olgularda, ortalamanın üzerinde değerlere sahip olgulara kıyasla, hastaliksız surviv nodal durumdan bağımsız olarak daha uzun bulunmuştur. Ancak çok değişkenli analizle bu belirginlik ortadan kalkmış, Ki-67 skoru prognozla daha anlamlı bir korelasyon göstermiştir.

ARJİROFİLİK NUKLEOLER ORGANİZE EDİCİ BÖLGELERİN (AgNOR) GÖRÜNTÜLENMESİ:

Nukleolus,* hücre proliferasyonu ve protein sentezinin kontrolünde yaşamsal bir rol oynamaktadır. Hızla bölünen hücreler ve yüksek metabolik aktiviteye sahip hücreler belirgin nukleoller gösterirler. Nukleoller organize edici bölgeler (NOR), nukleoller ile yakın ilişki gösteren DNA segmentleridir, ribozomal RNA'yı kodlayan genleri içerirler ve hücrenin protein sentezinin düzenlenmesinde katkıda bulunurlar. NOR'lar arjirofilik proteinlerle yakın ilişkidir ve sitogenetikçilerin uzun zamandır kullandığı bir gümüş boyama tekniğinin yeni bir modifikasyonu NOR'ların klasik histolojik kesitlerde görüntülenebilmesini sağlamış ve AgNOR'lar olarak tanımlanmasına neden olmuştur (10). Sitogenetikçiler AgNOR'ların 13, 14, 15, 21 ve 22 nolu kromozomların kısa kollarında lokalize olduğunu bulmuşlardır.

Genellikle malign hücreler benign olanlardan belirgin olarak daha fazla sayıda AgNOR içermektedir, ancak bazı borderline malign ve benign lezyonlar arasındaki AgNOR değeri farklılıkları tanısal açıdan yardımcı olamamaktadır. Smith ve Crocker (11) benign ve malign meme lezyonları arasında ortalama sayımlarda belirgin bir farklılık gözlemişlerdir. Ancak çalışmalarındaki iki *in situ* lobüler karsinom ile beş intraduktal karsinomun AgNOR sayımları infiltratif karsinomlara benzer sonuç vermiş ve epitelyozis ile adenozisteki değerlerden belirgin farklılık göstermiştir. Ayrıca diğer benign lezyonlara kıyasla araştırmacılar epitelyoziste daha yüksek sayımlar elde etmişlerdir. Di Stefano ve ark. (12), ortalama AgNOR sayısı ile histolojik derece arasında korelasyon saptamamış, mitotik indeks ile ise istatistik olarak çok belirgin olmayan bir korelasyon bulmuşlardır.

NOR'ların histolojik kesitlerde görüntülenmesini sağlayan gümüşleme tekniğinin bazı sınırlamaları vardır. En belirgin problemler, sayımların çok fazla zaman alması, kesit kalınlığındaki farklılıklar ve tesbit yöntemlerindeki değişikliklerin sayımlara olan etkisi ile gözlemciler arası farklı değerlendirmelerdir. Bu faktörler AgNOR sayımının da subjektif bir değerlendirme yöntemi olmasına ve sonuçlardaki güvenilirliğinin tartışılmasına neden olmaktadır.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

İmmünohistokimyasal yöntemlerle hücre proliferasyonu değerlendirilen mevcut antikorlar hücre siklusunun aynı komponentini ölçmezler. Hücre proliferasyonuna ilişkin proteinlere karşı geliştirilmiş olan bu antikorları kullanan immünohistokimyasal çalışmalar hücre proliferasyonunun hızı hakkında bilgi vermez, sadece hücre proliferasyonunun statik durumu değerlendirilebilirler.

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA)

PCNA mol, ağırlığı 36-kd olan nonhiston nükleer proteindir. DNA polimeraz daltanın bir yardımcı faktörü olarak işlev görür. PCNA, Miyachi ve ark. (13) tarafından SLE'li hastaların serumlarında otoantikorlar kullanılarak bulunmuştur. Proliferasyondaki ve istirahatteki hücre popülasyonlarının proteinlerinin iki boyutlu jel elektroforezlerini karşılaştırırken, Bravo ve Celis (14), 36-kd'lık bir proteini "cyclin" olarak tanımlamışlar ve bu proteinin PCNA ile aynı olduğu anlaşılmıştır. Mitozun başlangıcında rolü olan 56-kd'lık bir proteine de aynı ad verildiği için PCNA adı tercih edilmektedir.

PCNA stabil hücre siklusu ile düzenlenen bir nükleer proteindir ve hücre siklusu sırasında farklı fazlarda farklı miktarlarda salınır. Sentez hızı hücrelerin proliferasyon hızı ile direkt korelasyon gösterir. PCNA düzeyleri G1 ortasında hızla artar ve erken S fazında yükselmesi devam eder. S fazı boyunca yüksek kalır ve G2 fazı sırasında plato yapar, G2/M'den G1'e doğru azalma gösterir. Mitozdaki hücrelerin PCNA düzeyleri azalmıştır, erken G1'deki düzeylere benzer. Ancak PCNA'nın yarı ömrü 20 saat gibi oldukça uzun bir süre olduğu için, bazı hücre dizilerinde proliferatif hızın daha yüksek belirlenmesine neden olabilir, çünkü hücre siklusunu henüz terk etmiş olan hücrelerde de rezidüel olan degradasyona uğramamış PCNA proteinini bulunabilir (2).

Farklı antijenik determinantlara sahip değişik PCNA antikorları tanımlanmış ve bunların S fazı spesifikliği açısından farklılıklar görülmüştür. Bunlardan birçok malignitede prognostik değeri gösterilmiş olan, rutin formalin tesbitli, parafine gömülü dokularda çalışılabilen PC10 meme kansinomlarında prognozdan diğer belirleyicileri ve flow sitometrik proliferatif aktivite sonuçları ile korelasyon göstermemiştir (15, 16). Leonardi ve ark. (15)'nin çalışmasında PC10 ile saptanan PCNA indeksi Ki-67, mitoz sayısı, derece, tümör boyutu, lenf nodülü metastazı, reseptör içeriği ve p53 aberran gen ekspresyonu ile karşılaştırılmış ve bu parametrelerin hiçbirisiyle korelasyon bulunamamıştır. Bianchi ve ark. (17)'lerinin 173 lenf nodülü-negatif meme kansinomundaki çalışmasında ise, PC10 ile saptanan PCNA derecesi ile nükleer derece arasında korelasyon görülmüş, tek değişkenli analizde 5 yıllık relapssız surviv oranı ve toplam surviv ile belirgin ilişki görülürken, çokdeğişkenli analizlerde PCNA derecesi ile prognoz arasındaki ilişki düşük derecede bulunmuştur.

PC10 antikoruna ile elde edilen yukarıdaki sonuçlar, 19A2 antikoruna ile frozen kesitlerde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla farklıdır. 19A2 ile saptanan PCNA pozitifliği, timidin işaretleme indeksi, Ki-67 immünboyaması ve flow sitometri ile belirlenen S fazı fraksiyonu ile nükleer derece arasında korelasyon saptanmıştır (18,19). Battersby ve ark. (18) 19A2 boyanma skoru ile histolojik derece ve östrojen reseptör durumu arasında belirgin ilişki bulmuşlardır, ancak bu iki parametre de proliferatif aktiviteden ziyade, differansiasyonu belirlemektedir.

PCNA immünreaktivitesi fiksasyon süresine çok duyarlıdır ve fiksasyon süresindeki değişiklikler tümörlerin gerçek PCNA profillerini değiştirebilir. PCNA'nın kompleks yapısı ve uzun yarı ömrü hücre siklusunu terk etmiş hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesini sağlamakla birlikte, araştırma sonuçlarındaki farklılıklara da neden olabilmektedir. Ayrıca PCNA sadece hücre proliferasyonunda değil, DNA tamirinde de rol oynamaktadır ve PCNA'nın hücre proliferasyonu olmaksızın büyüme faktörleri ile de ortaya çıkarılabileceği gösterilmiştir (15).

Ki-67

Fare monoklonal antikoruna olan Ki-67 Gerdes ve ark. (20) tarafından 1983'de tanımlanmıştır. Ki-67 insan L428 Hodgkin hastalığı hücre dizisine karşı geliştirilmiştir ve hücre proliferasyonuna ilişkin bir nükleer proteininin henüz tanımlanmamış antijenik epitopunu gösterir. Son morfolojik çalışmalar antijenin nükleer matriksin bir bileşeni olduğunu düşündürmüştür. Lokalizasyonu değişkendir: interfazda nükleolus içinde, profazda nükleoplazmada, metafazda her bir kromozom ile ilişkili, telofazda nükleusa noktalar tarzında dağılmış olarak görülür. G1 fazının ortasında görül-

meye başlar ve hücre proliferasyonunun devamında tüm siklus boyunca (G1, S, G2 ve M fazlarında) mevcuttur (20). Siklusa katılmayan G0 ve erken G1 faz hücreleri reaksiyon vermez, dolayısıyla Ki-67 immünboyaması tümör büyüme fraksiyonunun ölçümünü sağlar.

Gerdes ve ark. (21)'lerinin 1986'daki bu konudaki ilk çalışmaları ardından, birçok araştırmacı benign ve malign meme lezyonlarında histolojik parametrelerle Ki-67 immünreaktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmış ve genellikle belirgin korelasyonlar saptamışlardır. Ancak Ki-67 boyanması yakın zamana kadar sadece frozen kesitlerde yapılabildiği için bunların çok azında klinik takip sonuçları verilebilmiştir. Bouzubar ve ark.(22)'nin 136 olguluk 30 ay izlenen meme kansinomu serilerinde yaptıkları araştırma sonucunda yazarlar, tümör hücrelerinin % 20'si veya daha fazlasında Ki-67 pozitifliğinin, erken rekürrens göstergesi olarak klinik gidişte belirleyici olduğunu ve histolojik parametrelerle de belirgin korelasyon gösterdiğini vurgulamışlardır.

Marchetti ve ark. (23) tüm histolojik tipler içinde en yüksek Ki-67 değerlerini medüller kansinomlarda saptamışlar, duktal kansinomlara göre lobüler ve tubuler kansinomlarda daha düşük Ki-67 değerleri bulmuşlardır. Yazarlar ayrıca düşük Ki-67 değerleri ile yüksek östrojen reseptör içeriği arasında da bir ilişki saptamışlardır.

Şahin ve ark. (24)'lerinin 42 lenf nodülü negatif meme kansinomu olgusunu kapsayan çalışmalarında, Ki-67 boyanması ile 5 yıllık hastalıksız surviv arasında belirgin korelasyon görülmüş, daha yüksek oranda boyanma gösteren olgularda daha kısa surviv izlenmiştir. Araştırmacıların hastalardan ölen olgularının tümünde incelenen tümör hücrelerinin en az % 15'inde Ki-67 pozitif bulunmuştur. Ki-67 boyanması ile nükleer derece arasında da pozitif korelasyon görülmüş, mitotik aktivite ve östrojen reseptör içeriği ile ilişki saptanmamıştır. Yapılan flow sitometrik inceleme sonuçlarının karşılaştırılmasında ise yüksek S fazı değerleri gösteren tümörlerde Ki-67 pozitifliği daha yüksek oranda saptanmış, ancak bu sonuç istatistik açıdan anlamlı düzeylere ulaşmamıştır. Yazarlar (24), düşük S fazı değerlerine sahip tümörlere kıyasla yüksek S fazı gösterenlerde Ki-67 ile S fazı arasında daha belirgin korelasyon olduğunu, düşük S fazı değerlerine sahip (örn. yavaş büyüyen) tümörlerde G1 fazındaki hücreler siklustaki hücrelerin belirgin bir kısmını oluşturabileceği için bu hücrelerin Ki-67 ile görüntülenirken, flow sitometri ile saptanamayacağını vurgulamışlardır.

Isola ve ark. (25) flow sitometri ile elde edilen tümör proliferatif aktivite değerleri ile anöploid DNA içeriği gösteren tümörlerin Ki-67 immün boyamasının sonuçlarının belirgin korelasyon gösterdiğini, anöploid tümörlerin S fazı değerlerinin diploid tümörlere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek Ki-67 pozitifliği ile mitoz sayısı ve histolojik derece ile ilişkili bulunmuş, nükleer pleomorfizm, tubul oluşumu ve lenf nodül durumu ile korelasyon saptanmamıştır.

Ancak meme kansinomlarında Ki-67 boyanmasını araştıran çalışmalarda hem Ki-67 pozitifitesinin insidensi, hem de boyanan hücrelerin yüzdesi çok değişkendir. Barnard ve ark. (26), Ki-67 boyanmasını olgularının tümünde (60 olgu) izlerken, Walker ve Campton (27)95 olguluk serilerinin % 18'inde hiç boyanma gözlememişler, % 26'sında ise sadece sitoplazmik reaktivite saptamışlardır. Ki-67 boyanmasının değerlendirilmesi için standart metodların geliştirilmesi (örn. sayım alanlarının seçimi, sayılacak hücre sayısı vb.) ve semikantitatif değerlendirme yöntemlerinin ya da görüntü analiz sistemlerinin uygulamaya sokulması araştırma sonuçlarının daha güvenilir olmasını sağlayacaktır. Geniş serilerde, uzun süreli takip ve daha objektif değerlendirme yöntemleri

uygulanarak Ki-67 boyanması ile diğer klinikopatolojik parametrelerin çok değişkenli analizleri Ki-67'nin prognostik olarak belirleyici rolünü daha iyi aydınlatacaktır.

FLOW SİTOMETRİ (FSM):

Flow sitometrik DNA analizi primer olarak prognozun belirlenmesi için kullanılan hızlı, objektif ve güvenilir bir yöntemdir. FSM incelemesiyle en sık olarak araştırılan prognostik öneme sahip kriterler ploidi analizi ve DNA sentezi gösteren (S fazı) hücrelerin oranıdır. Anöploidi ve/veya yüksek S fazı fraksiyonu genellikle yüksek dereceli agresif tümörlerde izlenir. FSM DNA analizi özellikle düşük evredeki tümörlerde adjuvan sağaltıma karar aşamasında yardımcı bir yöntemdir. FSM incelemesinde söz konusu olan parametreler kısaca şu şekilde tanımlanmaktadır:

Ploidi: Normal bir hücrede çift kromozom vardır ve bu nedenle normal DNA içeriğine diploidi adı verilir. Hücrelerin çoğunluğu G0/G1 fazında olduğu için ploidi analizinde bu populasyon seçilir. G0/G1 fazında DNA içeriği sabit olacağı için, bu dönemde hücrelerdeki DNA miktarındaki her türlü fark anormaldir ve anöploidi olarak tanımlanır. DNA içeriği normalden fazla iken hiperploidi, az iken hipoploidi'den söz edilir. DNA kantitatif olarak normalin iki katı olduğunda tetraploidi söz konusudur.

DNA indeksi (DI): Tanımlanan hücre popülasyonunun DNA içeriğinin normal diploid popülasyonunun DNA içeriğine oranıdır.

Anöploidi fraksiyonu (AF): Anöploid G1, S ve G2/M fazı hücrelerinin total hücre popülasyonuna oranıdır.

S fazı fraksiyonu (SFF): Hücre siklusunun S fazındaki hücre sayısının total hücre popülasyonuna oranıdır. G0/G1 piki ile G2/M piki arasındaki eğrinin altında kalan alanın hesaplanmasına dayanır.

Proliferatif indeks (PI): S+G2/M fazındaki hücre sayısının toplam hücre sayısına oranıdır.

Son yıllarda lenf nodülü pozitif ve negatif olan meme kansinomu olgularında ploidi ve hücre kinetik ölçümlerini önemli klinik parametrelerle karşılaştıran birçok çalışma yayınlanmıştır. Ancak metod ve teknik farklılıklar ve kısmen de kısa takip süreleri nedeniyle bu çalışmaların sonuçlarında büyük farklılıklar vardır. Buradaki en önemli soru, tümör DNA FSM'sinden elde edilen verilerin *survive* yada *rekürrens* açısından bağımsız prognostik bilgi verip vermediği konusunda farklı yanıtlar alınmıştır.

Çoğu meme tümörünün (% 60-70) anormal DNA içeriği vardır. Anöploidi sıklıkla yüksek histolojik derece, kısa hastalıklı *survive* ve kısa toplam yaşam süresi ile korelasyon gösterirken, diploid nükleer DNA içeriği tek değişkenli analizler kullanan birçok çalışmada meme kanserlerinde iyi prognoz göstergesi olarak bildirilmiştir (28-33). Ancak, diğer yazarlar ploidi düzeyleri ile prognoz arasında anlamlı bir korelasyon gözlememişlerdir (34-36). Araştırmacıların bir kısmı ise bu ilişkiyi lenf nodülü pozitif olgulara sınırlı olarak bulmuşlar (28, 29, 37) yada çok değişkenli analizlerde bu ilişkinin belirginliğini yitirdiğini vurgulamışlardır (29, 38, 39). Doğayısıyla çalışmalar, DNA indeksinin prognozu belirlemede bağımsız değere sahip olduğu alt grupları tanımlamaya yönelmiştir.

Anöploidi ve S fazı fraksiyonu meme kanserlerindeki diğer prognostik parametrelerle ilişkili bulunmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların çoğunda östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığının düşük S fazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca reseptör negatif grupta anöploidi insi-

densi belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Anöploidi primer tümörlü olgularda hastalıklı *survive* süresi açısından anlamlı korelasyon gösteren bir parametre olarak saptanmıştır (42). Erken evredeki olgularda 16 aylık izlemde *rekürrens* oranı anöploid tümörlerde iki kat daha yüksek bulunmuştur, ancak daha ileri evre hastalarda anöploidi belirgin bir korelasyon göstermemiştir (43). Benzer şekilde Hedley ve ark (31) 3.5 yıllık takip ardından erken evre meme kansinomu olgularda *relaps* riskini, anöploid tümörlü olanlarda % 44, diploid tümörlü olanlarda ise % 23 olarak saptamıştır. Hedley (32) anöploid DNA içeriğinin hem pozitif lenf nodülü sayısı, hem de kısa *survive* ile korelasyon gösterdiğini vurgulamıştır. Bu bulgular Dressler ve ark. (41)'nin 1000'in üzerinde olguda yaptıkları çalışma ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada anöploid tümörlü olguların ortalama S fazı yaklaşık % 10, diploid olanların ise % 3 olarak bulunmuş ve anöploid olgularda hastalıklı *survive* daha kısa saptanmıştır.

Solid tümörler içinde DNA ploidi analizinin en çok lenf nodülü negatif meme kanserinin tedavisine yaklaşımda katkısı olmaktadır. Lenf nodülü negatif meme kansinomlarından anöploid ve reseptör-negatif olanlar daha kötü prognostik gruba oluşturmaktadır ve adjuvan kemoterapi bu grupta önerilmektedir. Clark ve ark. (33)'nin lenf nodülü negatif 395 meme kansinomu olgusunda yaptıkları FSM incelemesinde dört prognostik grup tanımlanmıştır. Bunlar:

- 1- Diploid (normal) DNA içerikli ve yüksek S fazı oranı gösterenler
- 2- Diploid DNA içerikli ve düşük S fazı oranı gösterenler
- 3- Anöploid DNA içerikli ve progesteron reseptör pozitif
- 4- Anöploid DNA içerikli ve progesteron reseptör negatif

Lenf nodülleri negatif hastalardan anöploid tümörlü olanlar yanısıra, diploid DNA içerikli, yüksek S fazı oranı gösteren tümörleri olanların da *rekürrens* için risklerinin artmış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada lenf nodülü negatif olan olgulardan diploid DNA içerikli tümörlere sahip olanlar için prognozu belirlemede en yardımcı kriter S fazı oranı olarak bulunmuştur. Lenf nodülü negatif, diploid DNA içeriğine sahip olgulardan düşük S fazı değere gösterenlerin 84 aylık *survive* % 85 iken, yüksek S fazı oranına sahip olgularda % 36'dır. Bu bulgular Clark ve ark. (33)'nü lenf nodülü negatif olgular içinde diploid DNA içeriğine sahip yüksek S fazı gösterenlerinin adjuvan tedaviden yararlanabileceği sonucuna götürmüştür.

Balslev ve ark. (40) 421 lenf nodülü negatif meme kansinomunun ortalama 6.75 yıllık izlemi sonucunda premenopozal olgulardan DI < 0.96 olan hipoploid subgroup ile 1.44 < DI < 1.902 olanların erken *rekürrens*, kısa toplam *survive* ve *rekürrens* sonrası kötü *survive* gösterdiğini gözlemişlerdir. Yazarlar hipoploidinin yüksek SFF, düşük progesteron içeriği ve düşük diferansiasyon ile korelasyon gösterdiğini, sonuçta hipoploid tümörlerin hızlı proliferasyon gösterdiğini ve hormon bağımsız olduğunu vurgulamışlardır.

DI hesaplamada kullanılan histogramların aynısından türetilen AF, Gnant ve ark. (39)'larının çalışmasında nodal duruma kıyasla ikinci ve hatta nedereyde aynı derecede anlamlı bir prognoz göstergesi olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 191 meme kansinomu olgusu ortalama 10 yıl izlenmiş, % 40'dan fazla anöploid hücreye sahip tümörlerin daha agresif davrandığı görülmüştür. Yazarlar anöploid popülasyonunun oranının önemini, anöploid hücrelerin düşük oranda olduğu olgularda tümörlerin diploid tümörlere benzer davranış gösterdiğini vurgulamışlardır.

Bu konudaki son çalışmalar ise tümör hücrelerinin sito-

keratin gibi antikorlarla işaretlenerek iki renkli DNA FSM analizi ile tümör hücre popülasyonunun zemindeki stromal ve inflamatuvar komponentten ayrılarak incelenmesine yönelmiştir. Bu yöntem, FSM incelemelerde en önemli dezavantaj olarak gündeme gelen zemin hücrelerin sonuçları saptırması problemine çözüm vadetmektedir.

DNA ploidi analizi ayrıca meme kansinomu öyküsü olan hastalarda metastatik kansinom tanısının konmasına da yardımcıdır. Metastatik kansinom hücrelerinin olguların çoğunda primer tümör hücreleriyle aynı ploidiye sahip olduğu gösterilmiştir, bu da uzak bölgelerde metastatik yada primer kansinomun morfolojik olarak ayırıcı tanısına yardımcı olabilir.

BİLGİSAYARLI GÖRÜNTÜ ANALİZ SİSTEMİ

Tümör hücre nükleuslarında DNA içeriği ölçümünde alternatif bir yöntem de Feulgen metodu ile boyanan sitolojik preparatların statik sitometri ile incelenmesidir. Birçok alandan kolaylıkla veri toplayan kantitatif görüntüleme sistemleri ile 100 ya da daha fazla hücreyi yansıtan daha objektif olarak sadece malign hücreleri çalışma olanağına sahiptir ve seçilen tümör hücrelerinin nükleuslarındaki boyanma bilgisayar yardımıyla değerlendirilir. DNA'nın bu şekildeki kantitatif analizi Feulgen boyama reaksiyonuna dayanır. Hidroklorik asit DNA'nın riboz-pürin bağlarını hidrolize eder ve şeker aldehit kompleksi açığa çıkar. Daha sonra boya Schiff reaksiyonu ile bu komplekse bağlanır ve reaksiyon mavi renk verir. Bu boyanma reaksiyonu hücrede bulunan DNA'nın miktarıyla doğru orantılıdır. DNA'nın kantitatif analizi görüntünün her alt birimine bir optik dansite verip, sayılan her nükleusun toplam optik dansitelerinin hesaplanmasına dayanır. DNA analizi için imprint ya da aspirasyon preparatlarında en az 100 hücre incelenir ve sayılan her nükleusun DNA içeriği bir DNA histogramına dökülür. Histogram değerlendirilmesi sonucu hücre siklusunun G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki tümör hücrelerinin oranı belirlenerek, G0/G1 fazındaki tümör hücrelerinin ortalama DNA içeriği, istirahatteki nonneoplastik hücrelerin DNA içeriğine bölünerek DI elde edilir. DI 1.0'dan farklı bir değere sahipse tümör hücre popülasyonu anöloid olarak tanımlanır. Yüksek nükleer derece, anöloidi ve S (yada S+G2/M) fazındaki hücrelerin yüksek oranda oluşu meme kansinomlarında kötü prognoz ile korelasyon göstermektedir (44-46).

Siitonen ve ark. (47)'nin 134 lenf nodülü negatif meme kansinomu olgusunda yaptıkları çalışmada 5c düzeyini geçen DNA içeriğine sahip olgularında yüksek histolojik derece, artmış mitoz sayısı, FSM'de anöloidi ve yüksek S fazı oranı, c-erbB-2 onkoproteini ve p53 tümör süpressör gen salınımı saptamışlar ve bu olgu grubunda 8 yıllık surviv 5c hücresi negatif olan tümörlere göre daha kötü bulunmuştur.

Nükleer DNA içeriğinin belirlenmesinde önceleri imprint yaymalarında Feulgen boyalı nükleusların statik mikroskopiyotometre ile analizi yaygın olarak uygulanmıştır. Ancak çok zaman alıcı bir yöntem olması ve bu nedenle oldukça sınırlı sayıda hücrenin incelenebilmesi yöntemin yaygınlaşmasında olumsuz rol oynamıştır. Fakat tümörün sitolojik özellikleri göz önünde bulundurularak, zemindeki normal hücreler, hücre fragmanları ve hücre kümelerinin elenilmesi tekniğinin başlıca avantajıdır. FSM'nin kullanımı ise çok kısa sürede çok sayıda hücre nükleusunun değerlendirilebilmesini ve verilerin daha detaylı bilgisayar programları ile analizini sağlamıştır. Ancak bu yöntem ile nükleusların morfolojik düzeyde tanımlanması mümkün değildir ve örnekler genellikle çok sayıda normal nükleusları da içerdiği

için, bazı olgularda tümör hücre popülasyonunun tanımı güçleşmektedir. Normal hücrelerin tümör hücrelerinden çok daha yüksek sayıda olduğu olgularda anöloid yada hiperploide piklerin ayırd edilmesi olanaksızlaşabilir. Harvey ve ark. (48)'lerinin 130 meme kansinomu olgusunda yaptıkları çalışmada taze dokudan alınan yaymalarda yapılan statik sitometri ve parafine gömülü dokulardan alınan hücrelere uygulanan FSM analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Yazarlar olguların % 11'inde iki tekniğin farklı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bu olguların sonuçlarındaki tutarsızlığa neden olan en belirgin iki özellik şu şekildedir.

a- FSM'ye kıyasla görüntü analizinde çok daha az sayıda hücre ölçülebilmekte, bu nedenle CV (değişkenlik katsayısı) daha büyük olmaktadır. Sonuç olarak statik sitometri diploid ve diploide yakın anöloid pikleri ayırd etmekte yetersiz kalmaktadır.

b- FSM'de tetraploid bölgedeki küçük piklerin diploid bir hücre dizisinin G2/M piki mi, yoksa tetraploid hücre dizisinin G0/G1 piki mi olduğuna karar vermek güçtür. Ayrıca örneklem hataları ve anöloid hücrelerin hazırlama işlemi sırasında selektif olarak kaybı yöntemin dezavantajları arasındadır.

Modern istatistik programları kullanılarak parafine gömülü dokularda FSM ile ploidi tayini çok sayıda hücrenin hızlı ve yeterli olarak incelenebilmesini sağladığı için, günümüzde rutin uygulamada daha pratik görülmektedir. Ancak bazı olgularda tetraploid bölgede saklı kalabilecek ploide piklerinin nükleer DNA içeriğinin kesin olarak belirlenebilmesi statik sitometrik incelemeyi gerektirmektedir. Harvey ve ark. (48) bu yaklaşım ile iki teknik arasındaki uyumsuzluğun % 5'den daha aza indirgenebileceğini vurgulamaktadırlar.

Ayrıca bilgisayarlı görüntü analizi için gerekli donanımın geliştirilmesi immünohistokimyasal olarak lokalize edilen antijenlerin kantitatif ölçümünü sağlamaktadır. Dolayısıyla bilgisayarlı görüntü analizi ile birleştirilen immünohistokimyasal inceleme bugün için bu hücresel parametrelerin oldukça objektif değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. DNA (Feulgen metodu ile) ve immünohistokimyasal proliferasyon belirleyicilerinin kullanılmasının bir avantajı da bu tekniklerin çok küçük örneklerde uygulanabilir olması ve tümör morfolojisi ile korelasyona olanak tanımasıdır. Klinikteki tarama tekniklerinin daha sensitif oluşuna paralel olarak, meme kansinomlarının rutin olarak değerlendirilmesi için önerilen testlerin sayıca gittikçe artıyor olması patologları zamanla daha küçük tümör örneklerinde çalışmak durumunda bırakmaktadır. Dolayısıyla spesifik analizler çok küçük doku parçalarında yapılmak durumundadır ve bilgisayarlı görüntü analizi bu olanağı sağlamaktadır.

Sonuç olarak yukarıda tanımlanan hücre proliferasyonu değerlendirilmeye yönelik incelemeler özellikle evre I ve II olgularında tedavinin seçimi için hastaların değerlendirilmesinde günümüzde kullanılan yöntemler yardımcı olmaktadır. Son araştırmalar lenf nodülü negatif meme kansinomlarında DNA ploidi, proliferatif aktivite ve onkogen ekspresyonu gibi biyolojik özelliklerin bağımsız olarak prognostik öneme sahip olabileceğini göstermektedir. Bu özellikler her olguda uygun adjuvan sağtatımı seçmede ya da meme kansinomlarının düşük ve yüksek riskli gruplarını belirlemede klinisyene yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Ciatto S, Cecchini S, Grazzini G, Iossa A ve ark. Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes. *Neoplasma* 37:179-84, 1990.
2. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of mor

- phologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 97:4-13, 1992.
3. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 21:683-8, 1990.
 4. Meyer JS, Friedman E, McCrate MM, ve ark. Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labeling. *Cancer* 51:1879-86, 1983.
 5. Tubiana M, Pejovic MH, Chavandra N ve ark. The long term prognostic significance of the thymidine labing index in breast cancer. *Int J Cancer* 33:441-5, 1984.
 6. Silvestrini R, Daidone MG, Gasparini G. Cell kinetics as a prognostic marker in node negative breast cancer. *Cancer* 56:1982-7, 1985.
 7. McDivitt RW, Stone KR, Craig RB, Meyer JS. A comparison of human breast cancer cell kinetics measured by flow cytometry and thymidine labeling. *Lab Invest* 52:287-93, 1985.
 8. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-5, 1982.
 9. Gaglia P, Bernardi A, Venesio T, Caldarola B ve ark. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur J Cancer* 29A:1509-13, 1993.
 10. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G ve ark. Improvement in the staining and visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochem J* 18:5-14, 1986.
 11. Smith R, Crocker J. Evaluation of nucleolar organiser region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology* 12:113-25, 1988.
 12. Di Stefano D, Mingazzini PL, Scucchi L ve ark. A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. *Cancer* 67:463-71, 1991.
 13. Miyachi K, Fritzel MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-34, 1978.
 14. Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 84:795-802, 1980.
 15. Leonardi E, Girlando S, serio G ve ark. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45:416-9, 1992.
 16. Gillett CE, Barnes DM, Camplejohn RS. Comparison of three cell cycle associated antigens as markers of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 46:1126-8, 1993.
 17. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G ve ark. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in lymph node-negative breast cancer patients. *Cancer* 72:120-5, 1993.
 18. Battersby S, Anderson TJ. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *Hum Pathol* 21:781-4, 1990.
 19. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 136:1115-24, 1990.
 20. Gerdes J, Schwab U, Lemke H ve ark. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983.
 21. Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H ve ark. Growth fractions in breast cancers determined *in situ* with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol* 39:977-980, 1986.
 22. Bouzubar N, Walker KJ, Griffith K ve ark. Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 59:943-7, 1989.
 23. Marchetti E, Querzoli P, Marzola A ve ark. Assessment of proliferative rate of breast cancer by Ki-67 monoclonal antibody. *Mod Pathol* 3:31-5, 1990.
 24. Şahin A, Ro J, Ro JY ve ark. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. *Cancer* 68:549-57, 1991.
 25. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi O. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma: comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer* 65:1180-4, 1990.
 26. Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR ve ark. Proliferative index in breast carcinoma determined *in situ* by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 152:287-95, 1987.
 27. Walker RA and Camplejohn RS. Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinomas. *Br J Cancer* 57:281-3, 1988.
 28. Hedley DW, Rugg CA. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of N+ early breast cancer. *Cancer Res* 47:4729-35, 1987.
 29. Beerman H, Kluin PM, Hermans J ve ark. Prognostic significance of DNA-Ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 45:34-9, 1990.
 30. Kallioniemi OP, Blanco G, Alovaiiko M ve ark. Tumor DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 56:637-42, 1987.
 31. 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* 6:327-33, 1985.
 32. Hedley DW, Rugg CA, Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 44:5395-8, 1984.
 33. Clark GM, Dressler LG, Owens MA ve ark. Prediction of relaps or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320:627-33, 1989.
 34. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM ve ark. DNA index, S-phase fraction, histologic grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 61:671-4, 1990.
 35. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2 N0 breast cancer. *Am J Clin Pathol* 93:471-9, 1990.
 36. Winchester DJ, Duda RB, August CZ ve ark. The importance of DNA flow cytometry in node negative breast cancer. *Arch Surg* 125:886-9, 1990.
 37. Cornelisse CJ, van de Velde CJ, Caspers RJ ve ark. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 8:225-34, 1987.
 38. Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB ve ark. Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer* 65:1577-82, 1990.
 39. Grant MFX, Blijham GH, Reiner A ve ark. Aneuploidy fraction but not DNA index is important for the prognosis of patients with stage I and II breast cancer- 10-year results. *Ann Oncol* 4: 643-50, 1993.
 40. Balslev I, Christensen IJ, Bruun Rasmussen B ve ark. Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 56:16-25, 1994.
 41. Dressler LG, Seamer LG, Owens MA. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 61:420-7, 1988.
 42. McGuire WL, Meyer JS, Barlogie B, Kute TE. Impact of flow cytometry in predicting recurrence and survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 5:117-28, 1985.
 43. Eweres S-B, Langstrom E, Baldetorp B. Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinico-pathologic correlations. *Cytometry* 5:408-19, 1984.
 44. Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary cancer. *Anal Quant Cytol* 2:161-5, 1980.
 45. Fallén AG, Auer GU, Carstensen JM. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62:331-41, 1988.
 46. Fallén AG, Franzen SA, Auer GU. Predictive values of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer* 62:521-30, 1988.
 47. Siitonen SM, Kallioniemi OP, Helin HJ, Isola JJ. Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer as determined by image cytometry from tissue sections. *Hum Pathol* 24:1348-1353, 1993.
 48. Harvey JM, Sterrett GF, Berryman IL ve ark. Nuclear DNA content of human breast carcinoma: a comparison of results obtained by microspectrophotometry and flow cytometry of paraffin embedded tissue. *Pathology* 25:261-7, 1993.