

FLOW SİTOMETRİK DNA ANALİZİNİN TEMEL PRENSİPLERİ

Dr. Dilaver DEMİREL

ÖZET: Bu makalede flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri açıklanmıştır. Flow sitometri bir sıvı akımı içinde hücreleri hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçer. Bu işlemde hidrodinamik odaklama, lazer ışını, floresans, ışın toplayıcılar, dönüştürücüler ve bilgisayarlar önemli bir rol oynarlar. Total nükleer DNA içeriğini ölçerek tümör hücrelerinin ploidi durumunu ve S-faz fraksiyonunu (SPF) belirlemek mümkündür. Birçok çalışmada aneuploidi ve yüksek SPF'nin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Flow sitometri; kanser hastalarında tümörlerin tanısı, takibi ve prognozunda kullanılan ve hızla gelişen, yeni bir yöntemdir.

ANAHTAR KELİMELE: Flow sitometri, DNA analizi

SUMMARY: Basic principles of flow cytometric DNA analysis. The basic principles of flow cytometric DNA analysis are described in this article. Flow cytometry measures cells in a moving liquid stream quickly and reliably. Hydrodynamic focusing, laser beam, fluorescence, light collectors, converters and computers play an important role in this procedure. By measuring total nuclear DNA content it is possible to determine the ploidy status and S-phase fraction (SPF) of tumor cells. Aneuploidy and high SPF have been shown to be associated with poor prognosis in many studies. Flow cytometry is a rapidly improving new method used in the diagnosis, monitoring and prognosis of tumors in cancer patients.

KEY WORDS: Flow cytometry, DNA analysis.

Flow sitometri; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin bir alıcı cihaz tarafından bir sıvı içerisinde, tek sıra halinde alınarak bu hücrelerin veya partiküllerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu yöntem dört ayrı komponentten oluşur. Bunlar; 1- Işık kaynağı ve fokus yapan mercekler, 2- Akım sistemi, 3- Sinyal detektörleri ve dönüştürücüler ve 4-Bilgi toplama, depolama ve analiz için bilgisayar sistemidir. Süspansiyon içindeki hücreler tek sıra halinde bir ışık içinden geçerken her bir hücre üzerinde aynı zamanda birçok ölçümler yapılabilir. Hücreler lazer ışınına geçerken en azından bir ve muhtemelen de iki olay meydana gelir (1). İlk olay ışının yayılmasıdır. Işın kaynağına paralel olarak yayılan ışınlar (forward angle light scatter=FALS) hücrenin çapı, lazer ışınına 90 derece açı ile yayılan ışınlar (orthogonal veya 90 derece light scatter=90LS) ise hücrenin granularitesi ve iç yapısı hakkında bilgi verir. İkinci olay eğer analiz edilen örnek florokromlarla boyanmış ise oluşur. Florokromlar lazer ışınından enerji absorbe ederler ve onu daha düşük bir enerjiyle ve daha uzun dalga boyunda yeniden dışarı verirler. Dışarı verilen bu ışının miktarı hücrelerdeki florokromun miktarı ile orantılıdır. DNA boyamasında en çok kullanılan florokromlardan propidium iodide maksimum 488 nm dalgaboyunda uyarılır ve maksimum 620 nm dalgaboyunda ışın çıkarır. Yansıyan ışın ve yeni dalga boylarının bir anlam ifade etmesi için onların toplanması ve kullanılabilir bilgi haline çevrilmesi gerekir. Bu olay bir seri lens, filtre, detektör (photodio-

de ve photomultiplier tüpler) ve sinyal iletilici cihazlar tarafından yapılır. Değişik dalgaboyundaki ışınlar filtre ve aynalarca ayrıldıktan sonra photomultiplier tüplere verilir. Bir photomultiplier tüp adından da anlaşılacağı gibi foto-elektronları çoğaltır. Detektörlerde üretilen analog sinyaller (elektronik impuls) analog-digital dönüştürücüler tarafından bilgisayar analizi için digital sinyaller haline getirilirler.

Flow sitometrinin günümüzde en önemli uygulama alanları; a) floresan boyalarına tutunmuş monoklonal antikorları kullanarak hücrelerin fenotipik analizinin yapılması, b) hücrelerin taşıdıkları özelliklere göre ayırılması (cell sorting) ve c) DNA analizidir (2). Flow sitometrik DNA analizi hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntemle taze, dondurulmuş ve formalinde tesbit edilmiş, parafinde bloklanmış dokulardan elde edilen hücre süspansiyonları kullanılabilir. DNA içeriğinin flow sitometrik yöntemle analizinde bir floresan boyası kullanılır. Bu boya hücrelerin DNA sına bağlanır. DNA ya bağlanan boyanın miktarı ise her bir hücredeki total DNA ya orantılıdır. Böylece bir hücre popülasyonunda DNA da bir kayıp veya ilave (aneuploidi) tesbit edilebilir hale gelir. DNA içeriği anormallikleri tümörlerde hem kromozom anormalliklerinin bulunmasını, hem de koromozom sayısındaki değişiklikleri yansıtır (3). Ancak bu teknik total DNA'yı ölçtüğünden toplam DNA miktarlarında değişik yapmayan translokasyonlar gibi kromozom anormallikleri flow sitometri ile saptanamaz. Birçok floresan boyası bu amaçla kullanılmaktadır. Propidium iodide, ethidium bromide ve acridine orange en sık kullanılan boyalardır.

* Flow Sitometrik DNA Analizinin Temel Prensipleri,

Hücre bölünmesine gitmeden önce proliferen olan hücreler değişik fazlardan geçerler. G1 fazında hücreler RNA ve protein sentez ederler. S fazının başında diploid bir hücre her kromozomdan iki kopya içerir. Bu DNA içeriği 2N diye ifade edilir ve insanlarda 46 kromozomdan oluşur. S fazında DNA sentezi yapılır ve bu fazın sonunda hücresel DNA miktarı iki katına çıkar (N). G2 fazı S fazından sonra oluşur ve hücre bölünmesinden önceki RNA ve protein sentez fazıdır. M (mitoz) fazı o kadar kısadır ki bu fazda hücreler DNA içeriği bazında G2 fazındakilerden ayırtedilemezler. Her iki fazda da DNA miktarı 4N dir. Hücre bölünmesinden sonra oluşan yeni hücreler diploid dir. Bu hücreler yeni bölünmeler için hücre siklusuna devam edebilirler ancak bazen de istirahat fazına girerler. Bu faz G0 olarak da bilinir. G0 ve G1 fazındaki hücreler 2N DNA içeriğine sahip olduğundan DNA bazında birbirlerinden ayırtamazlar.

DNA histogramlarında y-aksisi hücrelerin (nükleusların) sayısını, x-aksisi ise artmakta olan floresansı (DNA miktarını) temsil eder. Normal lenfositler gibi aktif olarak proliferasyon göstermeyen bir hücre popülasyonunun analizinde S-faz fraksiyonu (SPF=S, phase fraction) ve G2/M fazlarında fazlaca hücre saptanmaz. Halbuki normal kemik iliği gibi aktif bir dokunun analizinde SPF ve G2/M fazında daha çok hücre görülecektir. Histogramlarda DNA içeriğinin yayılımı hücre popülasyonunu yansıtan pik çevresinde bir miktar değişkenlik gösterir. Bu değişkenlik boyama yönteminden, cihaz hatalarından veya DNA boyanmasında hücreden hücreye olan farklılıklardan meydana gelebilir ve hücre popülasyonunun G0/G1 piki için coefficient of variation (CV) olarak ifade edilir. CV hücre popülasyonunun ortalama pik kanal numarasının standart sapmaya bölünmesiyle belirlenir. Böylece CV histogramın kalitesini belirler. CV ne kadar küçük ise histogram o kadar güvenilirdir. Geniş bir CV peridiploid aneuploid pikin gizli kalmasına neden olabilir. Bu nedenle yaygın olarak kabul görmemekle birlikte 5.5 den daha yüksek olan CV'li olguları non-diploid (peridiploid) olarak kabul eden araştırmacılar mevcuttur (4).

Aneuploid hücre popülasyonunun rezidüel veya kontrol, normal popülasyona (diploid) oranla pozisyonu DNA indeksi (DI) olarak ifade edilir (2).

DI= Analiz edilen örneğin ortalama pik kanal numarası
Kontrol, normal popülasyonunun ortalama pik kanal numarası

olarak formüle edilir. Buna göre diploid (2N) popülasyonlarda DI=1 dir. Tetraploid (4N) popülasyonlarda ise DI=2.00 dir. Flow sitometrik bulgular değerlendirilirken, DNA histogramları;

- Sadece bir G0/G1 piki varsa diploid,
- Çentikli veya bir omuz oluşturan pik varsa near-diploid (peridiploid),
- İki ayrı G0/G1 piki varsa tek aneuploid,
- İki den fazla G0/G1 piki varsa multiploid,
- G2/M bölgesinde bulunan hücreler analiz edilen toplam hücre sayısının % 20 veya fazlasını oluşturuyorsa tetraploid olarak sınıflanır (5). DI 1 den küçük olan tümörler hi-

podiploid aneuploid, büyük olanlar ise hiperdiploid aneuploid olarak isimlendirilir. Hipodiploid aneuploid tümör ile hiperdiploid aneuploid tümörün ayırımının yapılabilmesi için aynı hastanın sağlam dokusundan, mümkünse tümörün geliştiği dokunun tümörsüz alanından kontrol hücre süspansiyonunun kullanılması gerekir. Tümörlü ve kontrol süspansiyonlar ayrı ayrı ve bir de karışık olmak üzere bir olgu için üç kez flow sitometrik yöntemle analiz edilir. Sonunda her üç histogram karşılaştırılır. Karışık histogramda sadece tümörün bulunduğu histograma oranla yükselmiş olan pik diploid piktir. Diğer pik (aneuploid olanı) histogramda diploid pikin solunda ise tümör hipodiploid, sağında ise hiperdiploid olarak sınıflanır. Hipodiploid tümörlerde prognoz genellikle daha iyi olduğundan bu ayırım önemlidir (6).

Ploidi tayinihe ilave olarak bir tümör popülasyonundaki hücrelerde proliferatif oranının belirlenmeside önemlidir. Bu oran genellikle SPF veya SPF+ G2/M olarak kabul edilir. SPF nun belirlenmesi SPF nundaki hücrelerin G2/G1 ve G2/M fazlarındaki hücrelerden histogramlarda kesin olarak ayrılması nedeniyle güçtür. Bununla beraber son zamanlarda SPF nu optimal düzeyde ayırabilen yöntemler geliştirilmiştir. Bu alanda en çok kullanılan yöntemler Rectangle Method ve Peak Reflectance Method'dur (7).

Şu'ana kadar temel prensiplerinden sözettiğimiz flow sitometrik DNA analizinin klinik uygulama alanı hızla genişlemektedir. Bu yöntem; 1-tedavi protokollerine tümör cevabının belirlenmesine 2-erken veya ileri evrelerde maligniteye sahip her bir hasta için tedavinin düzenlenmesine, 3-premalign olayların invaziv kansere ilerleme olasılığının tesbitine ve 4-malign tümörlü hastalarda yaşam süresinin tahminine olanak sağlar (8). Flow sitometrinin değişik sistemlerdeki uygulama alanları ve bu alanlardaki önemi ayrı başlıklar halinde sunulacaktır.

Flow sitometrik DNA Analizinin temel Prensipleri, DEMIREL

KAYNAKLAR

1. Johnson KL. Basics of flow cytometry. *clin Lab Sci* 1992; 5:22-4.
2. Martinez JE, Beck JR, AllsbrookWC, Pantazis CG. Flow cytometric DNA analysis. *Clinical Laboratory Science* 1990;3:180-3.
3. Barlogie B, Gohde W, Johnston DA, Smallwood L, Schumann J, Drewinko B. Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res* 1978;38:3333-9.
4. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Hermans J, Fleuren GJ. DNA flow cytometry and morphometry as prognostic indicators in advanced ovarian cancer: A step forward in predicting the clinical outcome. *Gynecol Oncol* 1988;29:176-87.
5. Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B, Killander D. Flow- cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984;5:408-19.
6. Newbury R, Schuerch C, Goodspeed N, Fanning J, Glidewell O, Evans M. DNA content as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1990;76:251-7.
7. Dean PN. Methods of data analysis in flow cytometry. In: *Flow Cytometry: Instrumentation and data analysis*. Orlando, FL: Academic Press, 1985:pp195-223.
8. Braly PS, Klevecz RR. Flow cytometric evaluation of ovarian cancer. *Cancer* 1993;71:1621-8.