

FLOW SİTOMETRİK ANALİZİN DIAGNOSTİK VE PROGNOSTİK ÖNEMİ: 8 OLGUNUN YENİDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Gökhan HAROVA (*), Arş.Gör. Yavuz TEKELİOĞLU (**), Dr. Ercüment OVALI (***)- Dr. Yavuz ÖZORAN (****)

ÖZET: Bu çalışmada, 8 farklı neoplazmin parafine gömülü dokularında, flow sitometrik analiz yöntemi ile DNA içerikleri ve proliferatif aktiviteleri araştırıldı. Bulgular, histopatolojik görünümle kıyaslanarak diagnostik değerleri tartışıldı. Prognoza ilgili bilgiler gözden geçirildi. DNA içeriği ve proliferatif aktivitenin, yalnızca seçilmiş olgularda, yardımcı bir diagnostik parametre olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELE: Flow sitometri, Parafine gömülü doku, DNA içeriği, proliferatif aktivite, Diagnostik parametre

SUMMARY: In this study, DNA content and proliferative activity by flow cytometric analyses from paraffin embedded tissues of 8 different neoplasm were investigated. Comparing with histopathologic appearances, diagnostic values of the findings were debated. Literature information about prognostic relationships was looked over. It was concluded that DNA content and proliferative activity only in selected cases are usable as a helper diagnostic parameter.

KEY WORDS: Flow cytometry, Paraffin embedded tissue, DNA content, Proliferative activity, Diagnostic parameter

GİRİŞ

Flow sitometrik doku analizi, solid doku tümörlerinde prognoz belirlenmesi ve tedaviye yanıtın izlenmesinde, gittikçe artan bir sıklıkla kullanılmaktadır. Diagnostik patolojide, morfolojik bulguların yeterli olmadığı borderline olgularda malignansinin ayırd edilmesinde, yardımcı bir histopatolojik parametre olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (1). Biz bu çalışmamızda, KTÜ Tıp fakültesi patoloji anabilim dalında histopatolojik tanısı verilmiş 8 adet solid doku tümörünün parafine gömülü dokularını flow sitometrik analiz yöntemiyle değerlendirerek, morfolojik bulgularla flow sitometrik bulguları karşılaştırdık. Prognoza yönelik literatür bilgileri, olguların prognozu hakkında yeterli bilgi olmadığı için, yorumlanmadan gözden geçirildi.

MATERYAL VE METOD

Olguların neoplastik kısımlarını temsil eden parafin bloklardan 30 mikron kalınlığında 4-5 adet kesit alındı ve deney tüplerinin içinde 10'ar dakika süreyle 3 kez ksilol, 2 kez saf etil alkol, birer kez sırasıyla 90%, 70%, 50%'lik etil alkoller-

den geçirilerek deparafinize edildi. Kesitler saf su içinde 6-12 saat bekletilerek rehidrasyonu sağlandı. Daha sonra petri kutusunda ince uçlu bir makasla iyice parçalanıp ufalanarak 1-2 ml distile su içinde süspansiyonu hazırlandı. Eşit hacimde, pH 1.5'a ayarlı 0.5%'lik pepsin çözeltisiyle, 37°C de, 30 dakika inkübe edildi. Katı kısımlar filtre edildikten sonra nötralize edilen hücreden zengin sıvı flow sitometrik yöntemle incelendi.

BULGULAR

Olguların histopatolojik tanıları ve flow sitometrik bulgular Tablo 1 de toplu olarak kısaca verilmiştir.

OLGU 1: 65 yaşında erkek hasta. 20 yıldır bulunan multinodüler guatrı son birkaç aydır hızla büyüme göstermiş. Bilateral total tiroidektomi materyalinin histopatolojik incelenmesinde sol lobda kapsülü invaze eden *Hurtle hücreli karsinom* izlendi.

Flow sitometride *DNA indeksi (D.İ.)* 1.321 olan *Peridiploidik aneploidi* ve yüksek proliferasyon aktivitesi saptandı. *S-phase fraction (SPF)*: 11.4%.

OLGU 2: 78 yaşındaki erkek hasta sol femur 1/3 proksimal shaftında patolojik kırık sonucu opere edilmiş. Küretaj materyalinin histopatolojik incelemesinde *folliküler tiroid karsinom metastazı* içeren kemik dokusu izlendi.

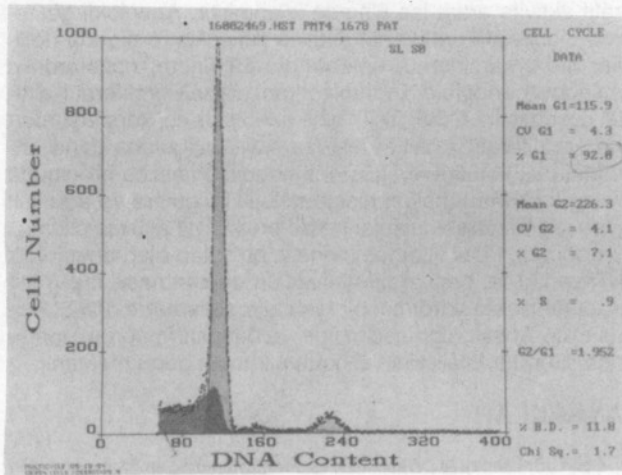
Flow sitometride *G0/G1* fazındaki hücrelerin 94.5% oranında ve *SPF*'nin 5.5% oranında olduğu *diploid* izlendi. (Resim 1).

* K.T.Ü Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. Uzmanı

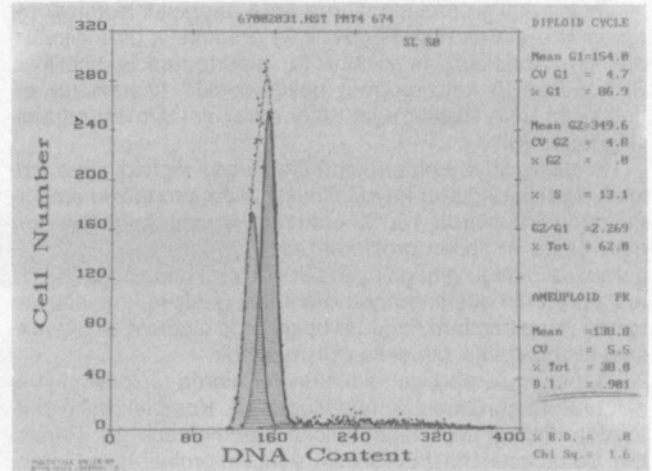
** K.T.Ü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

*** K.T.Ü Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D. Doçenti

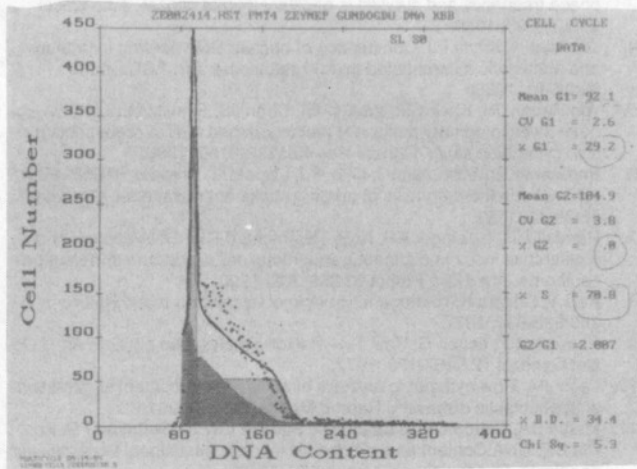
**** K.T.Ü Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. Profesörü



Resim 1 : Folliküler tiroid kansinom olgusuna ait histogramda diploidik pik



Resim 3 : İnfiltratif duktal kansinom olgusunda hipodiploidik aneplodi ve yüksek proliferatif aktivite.



Resim 2 : Epidermoid kansinom olgusunda yüksek proliferatif aktivite.

OLGU 3: 95 yaşındaki kadın hastanın sol ayak topuğunda 3 yıl içinde 2x2 cm çapa ulaşan, yüzeiden kabarık, sınırları düzgün, koyu renkli lezyon mevcut. Eksizyon materyalinde *nodüler tipte malign melanom* (Clark 4) izlendi.

Flow sitometride D.İ. 1.604 olan triploidiye yakın değerde aneplodi izlendi. SPF 22.2% oranında olup mitoz hızı yüksekti.

OLGU 4: 75 yaşında kadın hasta. 1.5 yıldır alın bölgesinde büyüyen ülsere vegetan lezyonun eksizyonel biyopsi sonucu *iyi diferansiye epidermoid kansinom*.

Flow sitometride, çok yüksek sentez hızına (SPF: 70%) sahip, mitoz hızı baskılanmış (G0/G1:29.2%, G2/M:0.8%) *diploid* hücre popülasyonu izlendi. (Resim 2).

OLGU 5: 20 yaşında kadın hasta. S.A.T'ne göre 14 haftalık gebeliği var. Ultrasonografide anembriyonik gebelik tespit edilmiş. β-H.C.G: 75000 ü. Terapötik küretajın histopatolojik tanısı *parsiyel mol hidatiform*.

Flow sitometride D.İ. 1.483 olan belirgin bir *triploidik aneplodi* izlendi. SPF oranı (8.4%) artmıştı.

OLGU 6: 10 yaşındaki erkek hasta ekzoftalmusa neden olan sağ periorbital kitlesi nedeniyle opere edilmiş. Ekstrak-

TABLO 1 : 8 ADET NEOPLAZMA AİT HİSTOPATOLOJİK TANI VE FLOW SİTOMETRİK BULGULARIN ÖZETİ.

HİSTOPATOLOJİK TANI	DNA PLOİDİ	PROLİFERATİF AKTİVİTE (S.P.F)
1 Hurtle hücreli tiroid Ca	peridiploidik aneplodi	11.4%↑↑
2 Folliküler tiroid Ca	diploidi	5.5%↑
3 Malign Melanom (Clark IV)	triploidik aneplodi	22.2%↑↑
4 Epidermoid Ca (iyi dif.)	diploidi	70%↑↑↑
5 Parsiyel mol hidatiform	triploidik aneplodi	8.4%↑
6 Ewing sarkomu	diploidi	9.9%
7 İnfiltratif duktal meme Ca	hipodiploidik aneplodi	13.1%↑↑
8 İndif. nazofarenks Ca	diploidi	11.9%↑↑

ranial, ekstrasdural, zigomatik kemiğe invaze, intraorbital tümör dokusu eksizyonu yapılmış. Histopatolojik incelemede Ewing sarkomu izlendi.

Flow sitometride düşük proliferasyon hızına (SPF 0.9%) sahip diploid hücre popülasyonu izlendi. (G0/G1 92%).

OLGU 7: 47 yaşında kadın hastada sağ memesinde 1 cm çapında kitlesi var. Modifiye radikal mastektomi materyalinin histopatolojik tanısı İnfiltratif duktal kansinom olup aksillada 9 adet hiperplazik lenf nodu izlenmişti. Estrojen reseptörü (+), nükleer ve histolojik grade 2, fibrozis (++)

Flow sitometride D.İ. 0.901 olan hipodiploidi izlendi. SPF oranı (13.1%) yüksekti. (Resim 3).

OLGU 8: 34 yaşındaki erkek hastada submandibüler lenf noduna metastaz yapmış indifferansiye nazofarenks kansinomu saptandı.

Flow sitometride, yüksek proliferasyon aktivitesi (SPF 11.9%) gösteren *diploidi* izlendi.

TARTIŞMA

Tiröidin Hurtle hücreli kansinomunda 51%, folliküler kansinomunda 61% oranında aneplodi izlenir ve prognostik anlamı vardır (2). Yaş, lenf nodu tutulumu, kapsül dışı yayılım gibi bağımsız prognostik faktör olduğu iddia edilmektedir. Ancak, uzak metastaz için bağımsız prognostik faktör değildir (3). SPF 2.5% den yüksek ise prognozu olumsuz etkiler (4).

Erken malign melanomlarda DNA aneuploidi histolojik bir parametre olarak değerlendirilir ve prognostik bir indikatördür (5). Aneuploidi, multiklonalite, hipertetraploid nitelikler, SPF yüksekliği kötü prognoz belirleyicisidir. Olgumuzda olduğu gibi DNA kapsamı ile Klark derecelendirmesi paralellik gösterir (6).

İyi diferansiye epidermoid karsinomda diploidi veya diploidiye yakın değerler kaydedilmiştir. Kötü prognozlu epidermoid karsinomlarda 16.7% oranında aneuploidi, 20.2% oranına kadar artabilen proliferatif aktivite bildirilmiştir (7). Olgumuzda olduğu gibi çok yüksek sentez hızına rağmen mitoz aktivitenin düşük oranda izlenmesi geniş nekroz alanları içeren neoplazmlara özgü bir bulgu olup olgunun iyi diferansiye histopatolojik tanısı ile çelişmektedir.

5. olgumuz, parsiyel mol hidatiformlarda triploidinin yüksek oranda görülmesi ile uyumludur (8). Komplet mol hidatiformda diploidi veya hiperdiploidi izlenmektedir (9). Persistan trofoblastik hastalıklardaki yüksek proliferasyon oranı premalign potansiyele işaretler (10). Prognoz, proliferatif aktiviteye oranla, DNA ploidi ile daha iyi korelasyon göstermektedir (11).

Ewing sarkomunda flow sitometri az çalışılmış olup fazla literatür bilgisi yoktur. Ancak olgumuzda olduğu gibi agresif seyre rağmen diploidi izlenebildiği bildirilmiştir (12).

İnfiltratif duktal meme karsinomunda aneuploidi 50-90% oranlarında izlenir. Aneuploidi ve yüksek proliferatif aktivite kötü prognozu gösterir (13). Aneuploidi, histopatolojik tipten bağımsız olup, tümör diferansiyasyonu ile ilişkilidir (14). Yaş ve tümör boyutu (2 cm den büyükse) ile ilişkili olarak artar (15). Estrojen reseptörü pozitif olanlarda daha düşük oranda izlenir. Bunlarda proliferatif aktivite de düşüktür. Hipoploidi, hipertetraploidi ve multiploidide kötü prognoz izlenir (16).

Nazofarenks karsinomlarında aneuploidi sıklıkla izlenmesine rağmen prognostik anlamı tartışmalıdır (17).

Morfolojik bulguların her olguda flow sitometri ile bağdaşmadığı görülmektedir. Örneğin kemik metatazi bulunan tiroid folliküler karsinomunda ve indifferansiye nazofarenks karsinomunda aneuploidi izlenmezken yalnızca proliferatif aktivitenin artmış olması malignensi ile uyumludur. Ayrıca Ewing sarkomu olgusunda da malign özellikle morfolojiye sahip neoplazmin aneuploidi ve proliferatif aktivite göstermemesi literatürde de bildirildiği gibi bu neoplazma özgü bir bulgu olarak değerlendirilmelidir. Bununla birlikte malign melanomda Clark derecelendirmesiyle ve morfolojik bulgularla uyumlu aneuploidi varlığı, morfolojik bulguları belirgin olmayan parsiyel mol hidatiformda belirgin triploidi, her iki olgudaki yüksek proliferatif aktivite, hem diagnostik, hem de prognostik değeri olan bulgulardır. İnfiltratif duktal karsinom olgusunda da morfolojik bulgular aneuploidi varlığı ve yüksek proliferatif aktivite ile uyumludur. Estrojen reseptör pozitifliği ise prognostik açıdan değerlendirildiğinde flow sitometrik bulgularla çelişmektedir.

Parsiyel mol hidatiform olgusunu saymazsak aneuploidi, morfolojisi kesin olarak malign olan 7 olgunun 3'ünde, proli-

feratif aktivite artışı ise 6'sında izlenmiştir. Aneuploidi gösteren 3 olguda da proliferatif aktivite yüksektir. 3 olguda (folliküler tiroid karsinomu, epidermoid karsinom, nazofarenks karsinomu) aneuploidi izlenmiyorken yüksek proliferatif aktivite izlenmiştir. Görüldüğü gibi aneuploidi ile karşılaştırıldığında proliferatif aktivite, histopatolojik bulgularla daha anlamlı olarak korelasyon göstermektedir. Yalnızca bir olguda (Ewing sarkomu) malign histopatolojik bulgulara ve agresif seyre rağmen ne aneuploidi ne de proliferatif aktivite izlendi.

Sonuçta, Flow sitometrik analiz bulguları olan aneuploidik DNA varlığı ve proliferatif aktivitenin saptanması, malignite ayırıcı tanısında yardımcı bir histolojik parametre olarak kullanılabilir. Ancak olgu seçiminde ve bulguların yorumlanmasında, literatür bilgilerinin dikkate alınması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Flow cytometric analysis of paraffin embedded tumors. Implications for diagnostic pathology. *Hum Pathol* 17: 435-437, 1986.
2. Kleini PJ, Joensuu H, Eerola E. DNA aneuploidy in anaplastic carcinoma of the thyroid gland. *Am J Clin Pathol* 89:154-159, 1988a
3. Hrafnkelsson J, Stal O, Eneström S, et al. Cellular DNA pattern, S-phase frequency and survival in papillary thyroid cancer. *Acta Oncol* 27:329-333, 1988.
4. Joensuu H, Kleini PJ. Comparison of nuclear DNA content in primary and metastatic differentiated thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol* 89:35-40, 1988b
5. von Roenn JH, Kheir SM, Wolter JM, Coon JS. Significance of DNA abnormalities in primary malignant melanoma and nevi, a retrospective flow cytometric study. *Cancer Res* 46:3192-3195, 1986.
6. Bartkowiak D, Schumann J, Otto, FJ, Lippold A, Drepper H. DNA Flow cytometry in the prognosis of primary malignant melanoma. *Oncology* 48:39-43, 1991.
7. Randall MB, Geisinger KR, Kute TE, Prichard RW. DNA content and proliferative index in cutaneous squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. *Am J Clin Pathol* 93:259-262, 1990.
8. Kajii T, Ohama K. Androgenetic origin of hydatiform mole. *Nature* 268:633-634, 1977.
9. Vassiakos P, Iotton G, Kajii T. Hydatiform moles: two entities. *Am J Obstet Gynecol* 127:167-170, 1977.
10. Lage JM. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 36:31-35, 1991.
11. Martin DA, Sutton GP, Ulbright TM, Sledge GW Jr, Stehman FB, Ehrlich CE. DNA Content as a prognostic index in gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 34:383-388, 1989.
12. Mellin W, Dierschauer W, Hiddemann W, et al. Flow cytometric DNA analysis of bone tumors. *Curr Top Pathol* 80:115-152, 1989.
13. Bichel P, Poulsen HS, Andersen J. Estrogen receptor content and ploidy of human mammary carcinoma. *Cancer* 50:1771-1774, 1982.
14. Fallén AG, Franzen SA, Auer GU. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer* 62:521-530, 1988b.
15. Corhelisse CJ, van de Velde CJ, Caspers RJ, Moolenaar AJ, Hermans J. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 8:225-234, 1987.
16. Coulson PB, Thornthwaite JT, Wolley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D. Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 44:4187-4196, 1984.
17. Costello F, Mason BR, Collins RJ, Kearsley JH. A clinical and flow cytometric analysis of patients with nasopharyngeal cancer. *Cancer* 66:789-795, 1990.