

OVER VE ENDOMETRİUM KANSERLERİNDE FLOW SİTOMETRİK DNA ANALİZİNİN DEĞERİ

Dr. Dilaver DEMİREL

GİRİŞ

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. Süspansiyon içindeki hücreler tek sıra halinde bir ışık içinden geçerken her bir hücre üzerinde aynı zamanda birçok ölçümler yapılabilir. Bu ölçümler forward angle light scatter (FALS), orthogonal veya 90° light scatter (90 LS) ve floresans'ı içerir. FALS hücre boyutları hakkında bilgi sağlar. 90 LS granülarite veya hücrenin iç yapısı hakkında bilgi verir. Floresan boyaları ise bazı hücresel komponentleri işaretlemek için kullanılır. Flow sitometrinin günümüzde en önemli uygulama alanları: a) floresan boyalarına tutunmuş monoklonal antikorları kullanarak hücrelerin fenotipik analizinin yapılması, b) hücrelerin taşıdıkları özelliklere göre ayırdedilmesi (cell sorting) ve c) DNA analizidir (1).

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 anormalliliklerinin bulunmasını, hem de kromozom sayısındaki değişiklikleri yansıtır (2). Ancak bu teknik total DNA yı ölçtüğünden toplam DNA miktarlarında değişiklik 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.

Hücre siklusunda G0/G1 fazındaki replike olmayan diploid hücreler aynı DNA içeriğine sahiptirler. Bu DNA içeriği 2N diye ifade edilir ve insanlarda 46 kromozomdan oluşur. S-fazında DNA sentezi yapılır ve hücresel DNA miktarında artış olur. G2 ve M (mitoz) fazındaki hücreler 4N DNA içeriğine ulaşmış olurlar. Mitozdan sonra orijinal hücrelerin yerini 2N DNA içeriğine sahip yeni hücreler alır. DNA histogramlarında y-aksis'i hücrelerin (nükleusların) sayısını, x-aksis'i 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 saptanamaz. Halbuki normal kemik iliği gibi aktif bir dokunun analizinde daha yüksek SPF ve G2/M fazında hücreler 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

olara 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 bir 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 (3).

Aneuploid hücre popülasyonunun rezidüel veya kontrol, normal popülasyona (diploid) oranla pozisyonu DNA indeksi (DI) olarak ifade edilir (1).

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 histogramlarında 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
- İkiden fazla G0/G1 piki varsa multiploid,
- G2/M bölgesinde bulunan hücreler analiz edilen toplam hücre sayısının % 20 veya fazlasını oluşturuyorsa tetraploid olarak sınıflanır. DI 1 den küçük olan tümörler hipodiploid 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 birde 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 altında ise tümör hipodiploid, sağında ise hiperdiploid olarak sınıflanır. Hipodiploid tümörlerde prognoz genellikle daha iyi olduğundan bu ayırım önemlidir (5).

Ploidi tayinine ilave olarak bir tümör popülasyonundaki hücrelerde proliferatif oranın belirlenmesinde önemlidir. Bu oran genellikle SPF veya SPF+ G2/M olarak kabul edilir. SPF nun belirlenmesi SPF nundaki hücrelerin G:0 /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 (6).

Klinik uygulamada flow sitometrik DNA analizi; 1-tedavi protokollerine tümör cevabının belirlenmesine 2-erken veya ileri evrelerde maligniteye sahip her bir hasta için tedavinin

TABLO 1 : OVER KANSERLERİNDE PLOİDİ İLE YAŞAM SÜRESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Kaynak	Hasta sayısı	% Aneuploid	Beş yıllık ortalama yaşam süresi, % Diploid	Aneuploid
Rodenburg ve grubu (3)	74	83	82	20
Friedlander ve grubu (13)	128	73	45	10
Murray ve grubu (14)	40	60	74	22
Iversen (15)	50	52	42	9
Brescia ve grubu (16)	99	48.5	50	22
Blumenfeld ve grubu (17)	84	61	25	18
Volm ve grubu (18)	37	81	75	38
Friedlander ve grubu (19)	91	69	75	20

	No	Diploid %	Aneuploid %	Şüpheli %
Seröz tümörler	182	76 (9.4)	21 (31.6)	3
Müsinöz tümörler	58	69 (22.5)	31 (83)	-
Endometrioid tümörler	3	100	-	-

TABLO 2 : İNGİLİZCE LİTERATÜRDE, HİSTOLOJİK TİP BELİRTİLEN ÇALIŞMALARDA, OVERİN DÜŞÜK MALİGNİTE POTANSİYELLİ TÜMÖRLERİNDE DNA İÇERİĞİ VE PROGNOZ İLİŞKİSİ.

Parantez içindeki sayılar nüks veya ölüm oranını göstermektedir.

düzenlenmesine, 3-premalign olayların invaziv kansere ilerleme olasılığının tesbitine ve 4-malign tümörlü hastalarda yaşam süresinin tahminine olanak sağlar (7).

OVER KANSERLERİ

Over kanseri tedavisindeki son gelişmelere rağmen bu tümöre sahip olan hastaların prognozu tedavi rejimlerinden çok prognostik faktörlere bağlıdır (7-9). Over kanserlerinde en önemli prognostik faktörler; klinik stage, histolojik tip, tümör grade'i, cerrahi sonrası rezidüel tümör çapı, ascite ve hasta yaşıdır. Ancak bu faktörler açısından aynı özelliklere sahip olan kanserler biyolojik davranışları açısından önemli ölçüde farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenle prognostik tahmini için daha objektif ve her olgu için kolaylıkla uygulanabilen bir yöntem ihtiyacı vardır. Over kanserlerinde hücrel DNA içeriğinin prognostik önemi 1971 yılından beri bilinmektedir (10). Ancak o yıllarda kullanılan absorpsiyon sitometri (absorption cytometry) tekniğinin uygulanmasının güç ve zaman kaybına neden oluşu bu tekniğin klinik uygulama alanı bulmasını engellemiştir. Flow sitometrinin tıp dünyasına kazandırılması ile birlikte hücrel DNA içeriğinin daha doğru ve kolayca ölçülebilmesinin yanında birçok diğer hücrel özellikler de ölçülebilir olmuştur (2, 11). Başlangıçta flow sitometrik analiz için taze veya frozen dokuların gerekli olması nedeniyle bu tekniği kullanan ilk çalışmalar ileriye dönük olarak (prospektif) ve sadece az sayıda hasta üzerinde yapılabilmekti. Orijinal olarak Hedley ve grubu tarafından bildirilen ve birçok modifikasyonlarla yaygın bir uygulama alanı bulan bir yöntemle parafin bloklardan elde edilen dokularda DNA içeriğinin flow sitometrik tayini mümkün olabilmekti (12).

Bircok araştırmacı tarafından aneuploidinin over kanserinde kısa yaşam süresinin tahmininde en önemli belirleyici olduğu bildirilmiştir (Tablo 1), (3, 13-19). Over kanserleri konusunda en kapsamlı flow sitometrik çalışmalardan biri 128 olgulu serileri ile Friedlander ve grubuna aittir (13). FIGO stage 3 ve 4 kanserli hastalardan oluşan bu grupta olgula-

rın % 27 si diploid, % 73 ü ise aneuploid olarak sınıflanmıştır. Aneuploid gruba tüm olguların % 16 sını oluşturan multiploid tümörler de dahildir. Bu çalışmada tümör ploidi ve yaşam süresi arasında oldukça anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($P<0.0001$). Diploid DNA içeriğine sahip tümörlü hastalarda ortalama yaşam süresi 260 hafta iken, tek aneuploid ve multiploid tümörlerde ortalama yaşam süresinin 54 hafta olduğu görülmüştür. Multivariate analizle DNA ploidi'ye ilave olarak histolojik subtip, tümör grade'i, klinik stage, cerrahi tedavi sonrası rezidüel tümör volümü ve tedavinin etkileri de bir arada değerlendirildiğinde sadece DNA içeriği ve stage'in yaşam süresi açısından anlamlı prognostik faktörler olduğu saptanmıştır. Yalnızca stage 3 ve 4 tümörleri içeren bu çalışmadaki ilginç gözlemlerden birinin de diploid tümörlerle ilişkili olan iyi prognostik sadece stage 3 olgulara sınırlı olduğunun saptanmasıdır. Stage 4 tümörlerde DNA içeriği ne olursa olsun prognostik kötü olduğu dikkati çekmiştir. Bu fark stage tümörlerin tamamının metastatik yayılım sonucu oluşmayıp, bazılarının multifokal tumor genesis yoluyla gelişmiş olabileceğine bağlanmaktadır (17, 20). Multifokal tumorigenesis ile oluşan tümörlerin daha iyi bir prognoz gösterdiği konusunda kanıtlar mevcuttur (21). Daha sonraki çalışmaların çoğunda DNA içeriğinin hastanın geleceği açısından önemli bir belirleyici ve başlıbaşına prognostik faktör olduğu konusunda fikirbirliği oluşmuştur. Brescia ve grubu (16) 99 olgulu serilerinde tümörlerin % 48.5 inin aneuploidi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada 5 yıllık yaşam süresinin diploid tümörlü hastalarda % 50, aneuploid tümörlü hastalarda ise % 22 olduğu görülmüştür ($P<0.01$). Kallioniemi ve grubunun çalışmasında ise Cox regresyon analizinde ölüm riskinin diploid tümörlere oranla tek aneuploid tümörlerde iki kat, multiploid tümörlerde ise altı kat daha fazla olduğu saptanmıştır (22). Tetraploid DNA içeriğine sahip olan olgularda ise prognostik tek aneuploid ve multiploid tümörlerden oldukça iyi olduğu bildirilmiştir (17, 22). DNA içeriğine ilave olarak yaşam süresini etkileyen diğer faktörlerin stage ($P<0.001$), tümör pattern grade'i ($P<0.01$), DNA indeksi ($P<0.0$), ascit'in bulunması ($P<0.01$), peritoneal karsi-

nomatozis ($P<0.0001$) ve second-look laparotimide rezidüel tümör varlığı ($P<0.05$) olduğu saptanmıştır (16). Blumenfeld ve grubu da Cox regresyon analizle yaş ($P<0.001$), stage ($P<0.001$) ve ploidi'nin ($P<0.001$) en önemli prognostik belirleyiciler olduğunu tesbit etmişlerdir (17).

Over kanserlerinde aneuploidinin başlı başına ve en önemli prognostik faktör olduğuna ilişkin pek az kuşku kalmış olmasına karşın bazı araştırmacılar düşük DNA indeksiyle birlikte olan aneuploidinin prognostik öneminin gerçekte fazla olmadığını esas farkı yaratan unsurun yüksek DNA indeksi (DI) olduğunu savunmaktadır (13, 23). Klemi ve grubu (23) çalışmalarında diploid ve aneuploid seröz karsinomali hastalarda yaşam süresi açısından anlamlı bir fark görmemiş olmalarına karşın ($P=0.33$), DI 1.3 den yüksek olan hastalarda yaşam süresinin DI 1.3 den düşük olanlara (aneuploid tümörlü bazı olgular dahil) oranla çok daha kısa olduğunu bildirmişlerdir ($P=0.002$).

DNA ploidi'nin yaşam süresi ile gösterdiği korelasyonunun yanında diğer bazı prognostik faktörlerle de anlamlı olarak ilişkili olduğu bildirilmektedir. Klemi ve grubunun çalışmasında (23) DNA indeksi 1.3 den yüksek olan tümöre sahip hastaların sıklıkla 60 yaşın üstünde oldukları bildirilmiştir ($P=0.0002$). Bu çalışmada yüksek histolojik grade'in de $DI>1.3$ ile anlamlı bir korelasyon göstermesine karşın ($P=0.008$), stage ile tümörlerin DNA içeriği arasında bir ilişki saptanmamıştır. Blumenfeld ve grubu (17) da aneuploid tümörlü hastaların euploid (diploid veya tetraploid) tümörlü hastalardan daha yaşlı olduğunu bildirmişlerdir ($P<0.025$). Ploidi ile klasik prognostik faktörlerin en çok korelasyon gösterdiği çalışma Iverson ve Skaarland'a aittir (24). Stage I-II tümörlerin % 15 inde aneuploidi saptanırken, stage III-IV tümörlerin % 77 sinin aneuploid olduğu görülmüştür ($P<0.0005$). Aynı çalışmada grade I ve II tümörlerin sırasıyla % 29 ve % 33 ünde grade III tümörlerin ise % 75 inde aneuploid DNA içeriği tesbit edilmiş olup ($P<0.0005$), aneuploid tümörlü hastaların diploid tümörlü hastalara oranla daha sıklıkla postmenopozal evrede oldukları görülmüştür ($P<0.0005$). Bu çalışmada diploid tümörlü hastaların % 17 sinde, aneuploid tümörlü hastaların ise % 58 inde ascite saptanmıştır ($P<0.005$). Bununla beraber bazı çalışmalarda diploid ve aneuploid olgular arasında histolojik tip, stage ve grade açısından anlamlı bir fark görülmediği bildirilmiştir (14, 16, 17).

DNA ploidi nin stabil bir özellik olduğundan ve tüm tümör boyunca değişmediğinden histolojik grade ve diğer patolojik prognostik faktörlerden daha güvenilir bir kriter olduğu iddia edilmektedir (20, 25). Metastatik tümörlerle ikinci veya üçüncü laparatomilerde alınan örneklerde primer tümör ile aynı DNA içeriği saptanmıştır (17, 24). Öte yandan sayıları az da olsa bu görüşün aksini savunan araştırmacılar da mevcuttur. Bir çalışmada primer ve metastatik tümörler arasında sadece % 47 oranında DNA uygunluğu tesbit edilmiştir (26).

DNA ploidi nin flow sitometrik tayinine ilave olarak hücre siklusunun SPF nda bulunan hücrelerin oranı da tümörün proliferatif aktivitesinin belirleyicisi olarak ölçülmektedir. SPF over kanserlerinde az sayıda çalışmada belirlenmiştir. Araştırmacıların bazılarının over kanserlerinde SPF nun prognostik öneminin varlığını bildirmelerine karşın (18, 22, 27, 28) diğer çalışmalarda SPF ile prognoz arasında bir ilişki saptanmamıştır (16, 24). Barnabei ve grubu (27) çalışmalarında ortalama SPF nun aneuploid tümörlerde % 4,7, diploid tümörlerde ise % 7.0 olduğunu bildirmişlerdir ($P<0.0001$). Bu çalışmada DNA ploidi'nin prognostik olarak anlamlı olmadığı, ancak SPF nun yaşam süresi ile direkt

olarak korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ortalama yaşam süresinin SPF % 18 den düşük olan hastalarda 32 ay, yüksek olan hastalarda ise 12 ay olduğu bildirilmiştir ($P<0.001$). Klemi ve grubu (28) ise SPF % 11 den daha düşük malign over tümörüne sahip hastalarda prognoz daha iyi olduğunu bildirmişlerdir ($P=0.0002$). Bu çalışmada SPF nun diploidi ($P=0.02$) ve düşük DNA indeksi ($P=0.0001$) ile ilişkili olduğu da tesbit edilmiştir. Bazı araştırmacılar ise SPF ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki saptayamadıklarını ancak benign veya iyi diferansiye histolojik tiplerle, diploid DNA içeriğine sahip tümörlerde genellikle düşük SPF değerlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir (24, 29).

Şu ana kadar oluşmuş literatür bilgileri DNA flow sitometrinin çok yakında over kanserlerinde prognostik bir belirleyici olarak rutin uygulamada kullanılmasının kaçınılmaz olduğunu göstermektedir.

OVERİN DÜŞÜK MALIGNİTE POTANSİYELLİ TÜMÖRLERİ

Overin düşük malignite potansiyelli tümörüne sahip hastalar yüksek stage li olgularda bile cerrahi sonrası ilave bir tedavi olmaksızın genellikle çok iyi bir prognoz gösterdiğinden bu tümörlerde optimal postoperatif tedavi bilinmemektedir. Bununla beraber bu tanıyı alan bazı hastalarda tümörler daha agresif davranabilmekte olup, bu olgularda ilave tedavinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Eğer DNA içeriği veya diğer prognostik özelliklerden biri bu iki grup hastayı birbirinden ayırabilseydi radyo-kemoterapi daha etkin olarak uygulanabilirdi. Ancak genellikle gerektiğinden daha agresif yöntemlerle tedavi edilen bu hastalarda tedavinin komplikasyonlarından ölümün tümöre bağlı ölümden çok daha fazla olduğu bildirilmiştir (30). Baylor College Of Medicine, Methodist Hastanesinde bizim yaptığımız bir flow sitometrik çalışmada overin düşük malignite potansiyelli tümörüne sahip 42 olgudan 35 inde (% 83.3) diploid, 7 sinde (% 16,7) ise aneuploid DNA içeriği saptanmıştır. Aneuploid tümörlerde ortalama DNA indeksinin 1.18 (1.09-1.36) olduğu görülmüştür. Ortalama SPF diploid tümörler için %3.5, aneuploid tümörler için ise % 4.5 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda aneuploidi yüksek stage ($P<0.009$) ve iri tümör çapı ($P=0.06$) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterdi. SPF ile mitotik oran arasında direkt lineer bir ilişki saptandı ($P<0.001$). Ancak ne aneuploidi ne de SPF prognoz ile bir korelasyon göstermedi. Bir başka çalışmada 27 benign over tümörünün 3 ünde (% 11), 43 düşük malignite potansiyelli over tümörünün ise yedisinde (% 16) aneuploid DNA içeriği saptanmıştır (23). Ancak tüm aneuploid benign ve düşük malignite potansiyelli over tümörlerinde DI 1.3 den düşük bulunmuş olup takip periyodunda bu gruptaki hastalardan ölen olmamıştır. Bununla beraber bazı çalışmalarda aneuploidinin yüksek rekürrens ve ölüm riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tablo 2) (19,23-25,31-35). Sonuç olarak overin düşük malignite potansiyelli tümörlerinde flow sitometrik bilginin prognostik önemini iyice anlayabilmemiz için daha geniş serili ve uzun süreli postoperatif takibi yapılmış olgular üzerinde yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

ENDOMETRİUM KANSERLERİ

Endometrial kanserli hastaların prognozunu tahmin edilmesinde birçok klinik ve patolojik faktörlerin değerli olduğu bilinmektedir. Bu prognostik faktörlerin en çok kabul

görmüş olanları; klinik stage, histolojik tip, tümör grade'i ve myometrial invazyonun derinliğidir. Halen tedavi kararının oluşumunda bu faktörler temel alınmaktadır. Bununla beraber klasik prognostik parametrelerden daha objektif bilgiler veren ve kolay uygulanabilen flow sitometrik analiz endometrial kanserlerde prognostik önemini araştıran çalışmalar da hızla artmaktadır. Bu çalışmalarda endometrial kanserlerin % 18-27 sinde aneuploid DNA içeriği saptanmış olup, bunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (5, 36, 37). Newbury ve grubunun çalışmasında (5) 233 olguda flow sitometrik yöntemle DNA ploidi ve proliferatif aktivite (SPF+G2/M) tayin edilmiştir. Aneuploid olgularda DI 0.76 ile 2.41 arasında saptanmış olup, DI 1.5 den yüksek olan tümöre sahip hastaların % 74 ünde, diploid tümörlü hastaların ise % 13 ünde postoperatif takip nüks veya ölüm ile sonuçlanmıştır. DI 1.5 den daha düşük olan aneuploid tümörlü hastalarda prognoz diploid kanserli hastalardan biraz daha kötü olduğu ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Aneuploid olgulardan yedisinin hipodiploid DNA içeriğine sahip olduğu ve bu olgularda ölüm görülmediği bildirilmiştir. Bu çalışmada aneuploidi ile histolojik tip, tümör grade'i ve myometrial invazyon arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür. Adenokarsinomların % 16 sında aneuploid DNA içeriği tesbit edilirken, berrak hücreli kanserlerin % 38 inde, papiller seröz kansinomalara ise % 56 sında aneuploidi saptanmıştır. FIGO grade I tümörlerin tamamının diploid olmasına karşın FIGO grade III tümörlerin % 33 ünün aneuploid olduğu dikkati çekmiştir. Aneuploid DNA patterni myometriumun 1/3 iç kısmına invazyon gösteren tümör grubunda % 14, 1/3 dış kısmını da invaze eden tümör grubunda ise % 30 oranında bulunmuştur. Bu çalışmada proliferatif indeks (SPF+G2/M) ile yaşam süresi, histolojik tip, nükleer grade, pattern grade'i ve myometriyal invazyonun derinliği arasında bir korrelasyon saptanmamıştır. Iversen (36) aneuploid tümörlü hastalarda diploid tümörlere oranla daha yüksek rekürrens ve ölüm oranı tesbit etmiştir. Yazar SPF'nun aneuploid tümörlerde diploid tümörlere oranla daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada aneuploidi ile histolojik tümör grade'i arasında ilişki gözlenmesine karşın FIGO stage, myometrial invazyon derinliği veya hasta yaşı ile ploidi arasında benzer bir ilişki görülmemiştir. Lindahl ve grubu (37) DNA içeriğinin tümörlerde estrogen reseptör konsantrasyonu ve myometrial invazyon ile kombine edilmesinin daha iyi prognostik bilgi verdiğini bildirmişlerdir. Britton ve grubu (38) 256 hastadan oluşan serilerinde tümörlerin % 78 inin diploid, % 22 sinin aneuploid (% 5 tetraploid olgular dahil) DNA içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada diploid tümörlerin % 10 unda non-diploid olanların ise % 39 unda postoperatif nüks görülmüştür.

Baylor College Of Medicine, Methodist Hastanesinde endometriosissten gelişen malign tümörlü yedi olguda flow sitometrik çalışma yaptık. Endometriosis odağında gelişen tümör tipi altı olguda adenokarsinoma bir olgu ise endometrial stromal sarkoma idi. Flow sitometrik bulgular tüm olguların diploid DNA içeriğine sahip olduğunu gösterdi. Olgularımızın beşinde SPF belirlenebildi. Bu beş olguda SPF'nun 2.6-13.1 (ortalama 6.3) olduğu saptandı. Grade I tümörlerin tamamında SPF'nun düşük olduğu dikkati çekti (2.6-7.6, ortalama 4.7). SPF ile tümör çapı, klinik stage, histolojik tip ve yaşam süresi arasında ilişki saptanmadı. Endometriozisten gelişen malign tümörlerde ilk flow sitometrik çalışma olan bu çalışmada bulgular hangi olgunun yüksek riske sahip olduğunu göstermekte yetersizdi. Ancak bulgularımız genellikle endometrial kanserlerden daha iyi prognoza sahip olan

bu tümörlerde kromozomal anormalliklerin (varsa bile) düşük oranda olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; endometrial kanserlerde flow sitometrik yöntemin prognostik değeri henüz over kanserlerinde olduğu kadar kesinlik kazanmış olmasa bile şu ana kadar bu konuda oluşan literatür bilgileri DNA ploidi'nin endometrial kanserlerde önemli ve anlamlı bir prognostik belirleyici olduğunu ve yöntemin klinik uygulama alanına sahip olması gerektiğini göstermektedir.

FLOW SİTOMETRİK YÖNTEMLE TEDAVİ ETKİLERİNİN TAKİBİ

Tümörlü hastalardan kontrol biopsileri almaktaki bazı kısıtlılıklar ve geçmişteki teknik yetersizlikler nedeniyle insanlarda cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapinin rezidüel tümör hücrelerine etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. DNA içeriği ve hücre siklus analizinin flow sitometrik tayininin tıp alanına girmesiyle birlikte tümör tedavisinin hücre üzerine etkilerini değerlendirebilen yeni ve güçlü bir yöntem ortaya çıkmıştır. Bazı çalışmalarda flow sitometrik analizle kanser hücrelerinde postkemoterapötik hücre siklus değişiklikleri araştırılmıştır (39, 40). "Combination platinum-based chemotherapy" ile tedavi edilen hastalarda SPF ve/veya G2/M fazındaki hücrelerde artma veya DNA ploidy pattern değişiklikleri (aneuploid tümör popülasyonunun kaybolması) gibi tedavi sonrası hücre siklus değişikliklerinin klinik olarak tümörün tedaviye cevap vermesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İlk kemoterapi siklusundan sonra bu değişikliklerin olmamasının ise tümörün kullanılan kemoterapötik rejime rezistans gösterdiğini işaret ettiği şeklinde yorumlanmıştır.

Over kanserlerinin cerrahi olarak çıkarılmasının rezidüel tümör hücre siklusuna olan etkisi peritoneal sıvıdaki tümör hücrelerinde flow sitometrik yöntemle araştırılmıştır (41-43). Genellikle tümörün geniş bir kısmının çıkarılması halinde tümör hücre proliferatif fraksiyonunda belirgin bir artış olmasına karşın sadece tanı amacıyla biopsi alınan olgularda böyle bir değişiklik olmamıştır. Prolifere olan hücrelerin oluşturduğu pik postoperatif 5-7. günlerde oluşmakta ve daha sonra proliferasyon bazal düzeye inmektedir. Prolifasyon fraksiyonunda postoperatif artışın daha iyi bir prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu tümör cevabını oluşturan hastaların ortalama 32 ay yaşam süresine karşın oluşturmayanların ortalama 19 ay yaşam süresine sahip oldukları görülmüştür. Her bir hasta için ortalama postoperatif proliferasyon fraksiyonu (SPF = G2/M) belirlendiğinde, "Cisplatin-based chemotherapy" ye tam cevap veren olgularda proliferatif fraksiyonun bu tedaviye tam cevap veremeyen olgulara oranla daha yüksek (sırasıyla % 10.4 e karşı % 7.5) olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlar jinekolojik kanserlerde, uygun tedavinin seçiminde ve tedavinin etkisinin denetlenmesinde flow sitometrik analiz rutin olarak kullanılabileceği umudunu vermektedir.

KAYNAKLAR

1. Martinez JE, Beck JR, Allsbrook WC, Pantazis CG. Flow cytometric DNA analysis. Clinical Laboratory Science 1990;3:180-3.
2. 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.
3. 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.
4. Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B, Killander D. Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984;5:408-19.
5. 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.
6. Dean PN. Methods of data analysis in flow cytometry. In: *Flow Cytometry: Instrumentation and data analysis*. Orlando, FL: Academic Press, 1985; pp 195-223.
7. Braly PS, Klevecz RR. Flow cytometric evaluation of ovarian cancer. *Cancer* 1993;71:1621-8.
8. Ozols RF, Garvin J, Costa J, Simon RM, Young RC. Advanced ovarian cancer: correlation of histologic grade with response to therapy and survival. *Cancer* 1980;45:572-81.
9. Swenerton KD, Hislop JG, Spinelli J, LeRiche JC, Yang N, Boyes DA. Ovarian carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Obstet Gynecol* 1985;65:264-70.
10. Atkin NB. Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia: a clinical and histopathological assessment. *Cancer* 1971;27:1064-73.
11. Laerum OD, Farsund T. Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry* 1981;2:1-13.
12. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor SW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-5.
13. Friedlander ML, Hedley DW, Swanson C, Russell P. Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patient with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1988;6:282-90.
14. Murray K, Hopwood L, Volk D, Wilson JF. Cytofluorometric analysis of the DNA content in ovarian carcinoma and its relationship to patient survival. *Cancer* 1989;63:2456-60.
15. Iversen OE. Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma. *Cancer* 1988;61:971-5.
16. Brescia RJ, Barakat RA, Beller U, Frederickson G, Suhrlund MJ, Dubin N, Demopoulos RI. The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary. *Cancer* 1990;65:141-7.
17. Blumenfeld D, Braly PS, Ben-Ezra J, Klevecz RR. Tumor DNA content as a prognostic feature in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987;27:389-98.
18. Volm M, Bruggemann A, Gunther M, Klein W, Pfeleiderer A, Vogt-Schaden M. Prognostic relevance of ploidy, proliferation, and resistance: predictive tests in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1985;45:5180-5.
19. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 1984;44:397-400.
20. Friedlander ML. Gynecological cancer. In: *Clinical Flow Cytometry* Ed. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV, Baltimore, Williams and Wilkins, 1993; pp 263-70.
21. Woodruff JD, Julian CG. Multiple malignancy in the upper genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 1969;103:810-22.
22. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988;61:334-9.
23. Klemi PJ, Joensuu H, Kiihola P, Maenpää J. Clinical significance of abnormal nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer* 1988;62:2005-10.
24. Iversen OE, Skaarlanda E. Ploidy assessment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry. A clinicopathologic study. *Cancer* 1987;60:82-7.
25. Friedlander ML, Russell P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN. Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumors of borderline malignancy. *Pathology* 1984;16:301-6.
26. Coleman RE, Lurain Jr, August CZ. Flow cytometric analysis of clinical stage I endometrial carcinomas with lymph node metastases. Presented at the American College of Obstetricians and Gynecologists District VI Annual Clinical Meeting, Chicago, IL, October 29, 1991. (bu kaynak "Lurain JR. Clinical commentary. In: *Gynecological cancer*. In: *Clinical Flow Cytometry*. Ed. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Baltimore, Williams and Wilkins, 1993; pp 269-70" den alınmıştır).
27. Barnabei VM, Miller DS, Bauer KD, Murad TM, Rademaker AW, Lurain JR. Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1584-92.
28. Klemi PJ, Joensuu H, Maenpää J, Kiihola P. Influence of cellular DNA content on survival in ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 1989;74:200-4.
29. Christov K, Vassilev N. Flow cytometric analysis of DNA and cell proliferation in ovarian tumors. *Cancer* 1987;60:121-5.
30. Kurman RJ, Trimble CL. The behaviour of serous tumors of low malignant potential are they ever malignant? *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:120-7.
31. Kaern J, Trope C, Kjørstad KE, Abeler V, Petterson EO. Cellular DNA content as a new prognostic tool in patients with borderline tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 1990;38:452-7.
32. Seidman JD, Norris HJ, Griffin JL, Hitchcock CL. DNA flow cytometric analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential. *Cancer* 1993;71:3947-51.
33. Kuhn W, Kaufmann M, Feichter GE, Rummel HH, Schmid H, Hebrling D. DNA flow cytometry, clinical and morphological parameters as prognostic factors for advanced malignant and borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1989;33:360-7.
34. Kotlyo PK, Mihael H, Fineberg N, Sutton G, Roth L. Flow cytometric analysis of DNA content and RAS P21 oncoprotein expression in ovarian neoplasms. *Int J Gynecol Pathol* 1992;11:30-7.
35. Bell DA, Flotte TJ, Pastel-Levy C, Ware A, Pfeffer F, Colvin RB. DNA ploidy of ovarian serous borderline tumors (SBT) and their extraovarian implants (abstract). *Mod Pathol* 1989;2:8A.
36. Iversen OE. Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: A prognostic factor in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:770-6.
37. Lindahl B, Alm P, Killander D, Langstrom E, Trope C. Flow cytometric DNA analysis of normal and cancerous human endometrium and cytological-histopathological correlations. *Anticancer Res* 1987;7:781-90.
38. Britton LC, Wilson TO, Gaffey TA. Flow cytometric DNA analysis of stage I endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1989;34:317-22.
39. Sevin BU, Pollack A, Averette HE, Ramos RR, Greening S, Evans D. In vivo chemosensitivity testing in patients with gynecologic malignancies and nude mouse xenografts by monitoring cell kinetic parameters and DNA distribution patterns: a preliminary report. *Gynecol Oncol* 1986;24:27-40.
40. Sevin BU, Pollack A, Averette HE, Ramos R, Donato D. In vivo cell kinetic effects of cis-platinum on human ovarian cancer xenografts measured by dual parameter flow cytometry. *Cytometry* 1987;8:153-62.
41. Klevecz RR, Shymko RM, Blumenfeld D, Braly PS. Circadian gating of S-phase in human ovarian cancer. *Cancer Res* 1987;47:6267-71.
42. Klevecz RR, Braly PS. Circadian and ultradian rhythms of proliferation in human ovarian cancer. *Chronobiol Int* 1987;4:313-23.
43. Klevecz RR, Braly PS. Circadian and ultradian cytokinetic rhythms of spontaneous human cancer. *Ann NY Acad Sci* 1991;618:257-76.

Teşekkür: Bu makalenin hazırlanmasındaki katkıları nedeniyle Ş. Dilek ÖCAL'a (histositoteknisyen) teşekkür ederim.