

PEDİYATRİK DİFFÜZ NON-HODGKIN LENFOMALARDA ÇOKLU KÜÇÜK DOKU İNCELEME (TISSUE MICROARRAY) YÖNTEMİNİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL UYGULAMADA GÜVENİLİRLİĞİ

Dr. Safiye AKTAŞ, Dr. Gülden DİNİZ, Dr. Ragıp ORTAÇ

ÖZET: Bu çalışmanın amacı pediatrik diffüz Non-Hodgkin Lenfomalarda TMA (Tissue Microarray) yöntemi ile immünhistokimyasal olarak LCA, CD20, CD3, CD30 immün reaktivitesinin araştırılması ve rutin inceleme sonuçları ile karşılaştırılmasıdır.

Yirmi adet pediatrik diffüz Non-Hodgkin Lenfoma olgusunda hematoksilen eozin boyalı preparatlarda lezyonu örnekleyen bir alan seçildi. Bu alana karşı gelen blok alanından 2 mm çaplı biyopsi iğnesi ile manüel olarak her bir olgu için bir adet rebiyopsi uygulandı. Yirmi rebiyopsi, yeni bir bloğa referans kullanarak aynı düzlemde yeniden gömüldü. Hazırlanan 3 mikrometre kalınlığındaki kesitlere immünhistokimyasal yöntemle LCA, CD20, CD3, CD30 ve negatif kontrol uygulandı. Rutin kesitlerin sonuçları ile birebir uyum testi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Uygulanan rebiyopsilerin tümü LCA pozitif. CD20, CD3, CD30 incelemeleri rutin kesit immünhistokimyasal incelemeler ile uyumluydu. Bu nedenle bire bir uyum testi %100'dür.

Pediatrik diffüz Non-Hodgkin lenfomalarda immünhistokimyasal incelemede çoklu küçük doku incelemesi kısıtlı sayıda olgu içeren bu seride güvenilir bir yöntem olma izlenimi vermektedir. Bunda pediatrik diffüz Non-Hodgkin lenfomaların diffüz ve uniform lezyonlar olmasının katkısı olabilir.

ANAHTAR KELİMELE: Çoklu küçük doku incelemesi, çocukluk çağı, Non-Hodgkin lenfoma

SUMMARY: EVALUATING THE CONFIDENCE OF TISSUE MICROARRAY FOR IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN PEDIATRIC DIFFUSE NON-HODGKIN LYMPHOMAS. Although tissue microarray method is a current issue in pathology research, it is not widely used in routine procedures. The main reasons are the worry of the representability of the microarray of the whole tissue and the limited knowledge about the method. The increasing numbers of diagnostic and prognostic immunohistochemical parameters had become a high economic problem. There is need of confidence studies of tissue microarray for representability. The aim of this study to evaluate the confidence of tissue microarray for immunohistochemistry of LCA, CD20, CD3, CD30 in pediatric diffuse Non-Hodgkin lymphomas.

The typical tumor spot was chosen under microscopy for each of 20 cases in HE stained slides and marked on the corresponding spot on the tissue block. Cylindrical tissue columns of two mm diameter for all cases were punctured manually with a biopsy needle. The rebiopsies of 20 cases were arrayed in a new block using a guide. Serial sections in 3 micrometer thickness were taken and immunohistochemical procedure for LCA, CD20, CD3, CD30 was applied. The results were statistically evaluated by confidence test.

All of the rebiopsied cases were LCA positive, CD20, CD30, CD3 were correlated with routine procedure results. The confidence rate is 100%.

The tissue microarray method is reliable for immunohistochemistry in pediatric diffuse Non-Hodgkin lymphomas. The diffuse nature and uniform cellular composition of this tumor group might have played an important role.

KEY WORDS: Tissue microarray, childhood, Non-Hodgkin Lymphoma

GİRİŞ

"Tissue Microarray" (TMA) yöntemi patoloji araştırmalarında güncel bir konu olmakla birlikte rutin incelemede yerini almamıştır. Bunun temel nedenleri küçük doku incelemesinin lezyonu örnekleme yeterliliği kaygısı ve yöntemin yeterince tanınmamasıdır. Artan tanısal ve prognostik immünhistokimyasal parametrelerin, moleküler belirleyicilerin sayısı ekonomik yük getirmekte olduğundan, çoklu küçük doku incelemelerinin (tissue microarray) lezyonu örneklemedeki güvenliliğine yönelik çalışmalarla gereksinim vardır (1).

TMA'de önceden var olan parafin bloklardan iğne rebiyopsileri alınıp, yeniden test edilecek bir bloğa gömülmesi söz konusudur. Taze doku ve frozen kesitlerden de TMA yapılabilir. Böylece tek bir kesitte yüzlerce örnek incelenebilir (2-4).

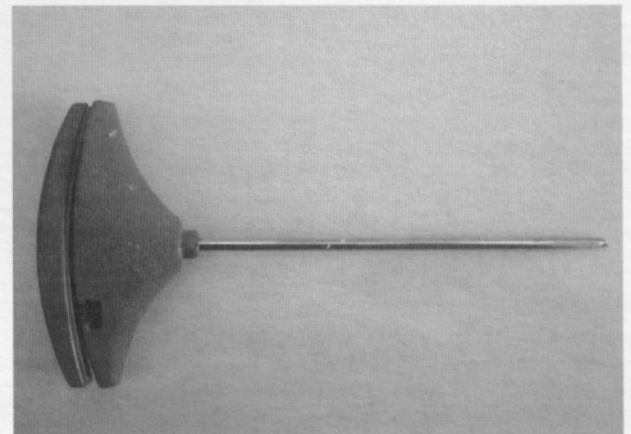
TMA rutin inceleme, histokimya, immünhistokimya, in situ hibridizasyon, in situ PCR için uygulanabilir. TMA özellikle kanser çalışmalarında ön plana çıkmaktadır. TMA'nın yaygınlaşması hızlı analiz ve ekonomi sağlayacaktır (5-11).

Bu çalışmanın amacı pediatrik diffüz Non-Hodgkin lenfomalarda (PDNHL) TMA ile immünhistokimyasal ola-

rak LCA, CD20, CD3, CD30 immünreaktivitesinin araştırılması ve rutin inceleme sonuçları ile karşılaştırılmasıdır.

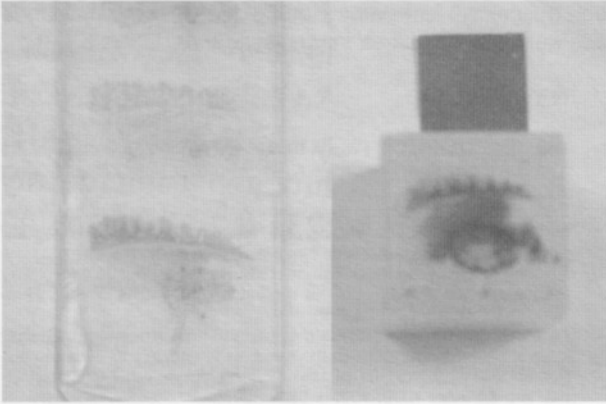
GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 2002-2004 yıllarında İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tanı almış yirmi adet pediatrik Non-Hodg-

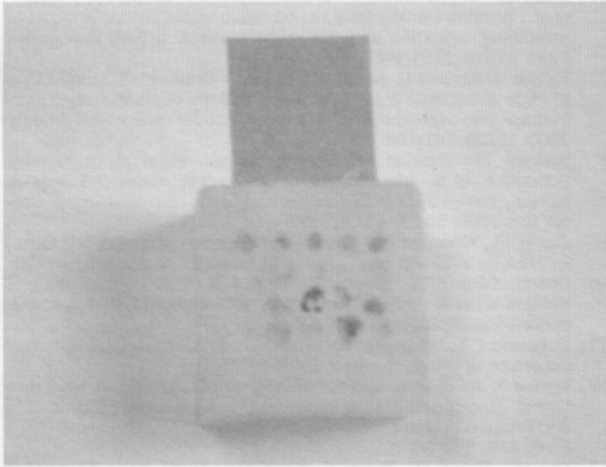


Resim 1: Manüel rebiyopsi alınmasında kullanılan mavi saplı Jhamsidi kemik iliği biyopsi iğnesi.

(The Turkish Journal of Pathology)

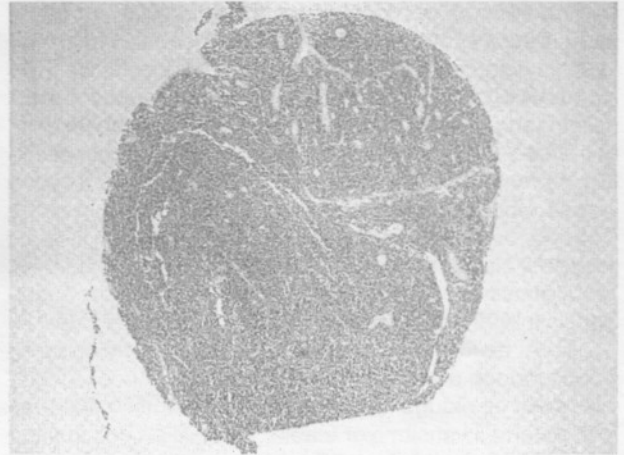


Resim 2: Lezyonu örnekleyen preparatın ve bloğun belirlenmesi.



Resim 3: Çok sayıda küçük doku rebiyopsilerinden hazırlanan blok.

kin lenfoma (PDNHL) olgusu yer almaktadır. Randomizasyonu sağlamak için olgular patoloji kayıt defterinden sondan başa tüm PDNHL tanısı almış olanlar arasından seçildi. Hematoksilen eozin boyalı prepatlarda lezyonu örnekleyen bir alan ışık mikroskopunda seçildi ve bu alana karşı gelen blok alanından 2 mm çaplı biyopsi iğnesi (Resim 1) ile manüel olarak her bir olgu için 1 adet rebiyopsi uygulandı (Resim 2). Önceden gömülüp soğutulan boş bir bloğa eşit uzaklıklarda 2 mm derinlikte 4x5 olarak 20 adet çukur hazırlandı. Çukur hazırlamada plastik blok-lama kaseti delikleri kalıp olarak kullanıldı. Çukurlar boyutlarının küçük dokular ile uyumlu olması istendiğinden aynı biyopsi iğnesi ile açıldı. Sol üst köşeye bir adet referans doku yeri ayrıldı. Yirmi rebiyopsi referans kullanarak aynı düzlemde yeniden gömüldü (Resim 3). Etüvde 40°C'de 15 dakika bekletilip doku gömülü yüzeye hafifçe basınç uygulayarak düzleştirme ile aynı düzlemde olma sağlandı. Hazırlanan 3 mikrometre kalınlığındaki kesitlere rutin immünhistokimyasal yöntemle (LSAB uyumlu) LCA, CD20, CD3, CD30 ve negatif kontrol (tümü DAKO, Danimarka, dilüe kitlerdir) uygulandı. Tüm antikorların uygulanmasında lamel kapatılarak antikor tasarrufu, tüm yüzeyle temas ve kurumanın engellenmesi sağlandı. Rutin kesitler uygulanmış olan preparatların sonuçları ile karşılaştırma yapılarak güvenilirlik (tutarlılık) oranı hesaplandı.



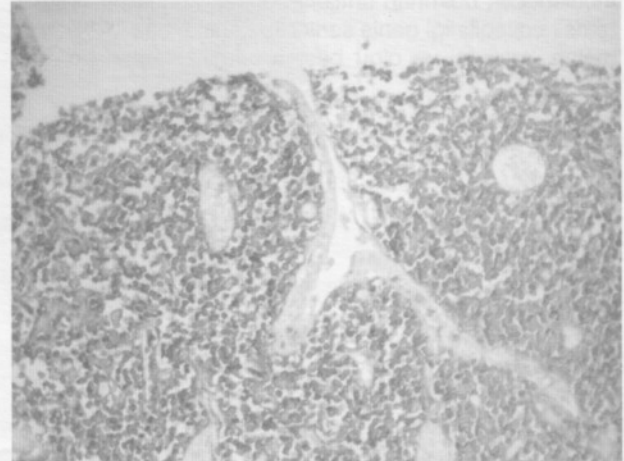
Resim 4: Yuvarlak konturlu küçük tümör parçasında CD45 (LCA) pozitifliği.

BULGULAR

Olguların 9'u batin yerleşimli olup, B hücreli Burkitt lenfoma grubunda idi. Üç olgu kemik iliğinde lenfoma infiltrasyonu olup, B hücreli lenfoblastik lenfoma idi. İki olgu mediasten yerleşimli T hücreli lenfoblastik lenfoma idi. Baş-boyun lenf düğümü yerleşimli 6 olgunun üçü anaplastik büyük hücreli lenfoma, birisi periferik T hücreli lenfoma, 2'si T hücreli lenfoblastik lenfoma idi. Olguların yaş ortalaması 7.05 (1-17) olup, 4 olgu kız, 16 olgu erkekti. Uygulanan rebiyopsilerin tümü LCA pozitifliği (Resim 4). CD20 (Resim 5), CD3, CD30 incelemeleri rutin kesit immünhistokimyasal incelemeler ile uyumluydu. Buna göre tutarlılık %100'dür. Bu nedenle discriminant analizi ile kappa değeri hesaplanmasına gerek duyulmamıştır.

TARTIŞMA

TMA ile ilgili ilk yayınlar 1998-2001 yıllarında National Human Genome Research Institute, Bethesda, USA'dan Kannonen, Kallioniemi ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (2-8). Son yıllarda artan teknolojik gelişme ile



Resim 5: B hücreli lenfoma bloğunun rebiyopsisinden hazırlanan preparatta CD20 pozitifliği.

arşiv dokularda retrospektif kohort çalışmaları yapılmaktadır. Birçok protein 60 yıldan fazla süre antijenitesini koruduğu için, yeni geliştirilen birçok belirleyicinin TMA yöntemiyle eski olgularda da denenebilmesi birçok hastalığın tanı ve sağaltımında yepyeni ufuklar açabilecektir. Bir dezavantajı, incelenen doku miktarının azalmasıdır. Bu nedenle TMA'de örneklenen rebiyopsilerin lezyonu temsil edip etmediğine dair bazı kuşklar doğmuştur. TMA'da örneklenen rebiyopsilerin yeterliliğine ilişkin en kapsamlı olanlar meme karsinom grubunun gerçekleştirdiği çalışmalardır. Camp ve ark. (9) her bir tümörde 2 rebiyopsinin %98 oranda yeterli olduğunu bildirmişlerdir (9-15).

TMA' de incelenen dokunun az olması, örneklemenin küçük olduğu durumlarda avantajlı olabilir. Ancak incelenen doku az olduğu için, tüm tümördeki antijen ekspresyon paternini yansıtmıyor olabilir. TMA ile en çok kullanılan yöntem immünhistokimya'dır. İmmünhistokimyasal incelemeler için alınan dokunun temsil edici olup olmadığının sınanması gerekmektedir (16,17).

Günümüzde otomatik ve manüel olmak üzere 2 tür TMA tekniği uygulanmaktadır. Otomatik yöntemde bir ekrandan seçilecek alan, büyüteç ya da stereomikroskop aracılığı ile işaretlenip ayarlanabilmektedir. Otomatik yöntemde donör bloklarda tüm alanların sergilenmesi ve işaretlenmesi çok daha kolay iken, manüel olanda alan seçimi, işaretlenmesi vb işlemler patolog tarafından tek tek yapılmaktadır. Bu nedenle otomatik yöntem manüel yöntemden 7 kat daha hızlıdır. Otomatik yöntemde rebiyopsilerin boyutunun ayarlanması da daha kolay olmaktadır ve rebiyopsiler 0.6, 1, 1.5, 2 mm boyutta olabilmektedir. Otomatik yöntemle DNA bazında incelemeler de mümkün olmaktadır (1-4).

Non-Hodgkin lenfoma üzerinde çok sayıda prognostik faktör çalışılmaktadır. TMA ile lenfomalar üzerinde çalışılan konular arasında cyclin gurubu, pax 5, p181N4C, CD44 ve sonic hedgehog protein, apoptoz sayımı yer almaktadır (2-8,12-14).

Sonuç olarak çalışmamızda PDNHL'larda immünhistokimyasal incelemede TMA güvenilir bir yöntem izlenimi vermektedir. Bunda PDNHL'ların diffüz ve uniform lezyonlar olmasının katkısı olabilir. Ayrıca çalışmamız az olguyu kapsayan bir pilot çalışma olduğu için TMA'nın güvenilirliğinin daha geniş serilerde doğrulanması şarttır. İncelenecek dokunun antijenik olarak küçük bir örnekte temsil edilebilirliği geniş serilerde kanıtlanırsa TMA çalışmaları, maliyeti ve olgu başına teknik eleman gereğini

çok düşürdüğü için patoloji pratiğinde ve araştırmalarında çok kullanışlı olacak ve yaygınlaşacaktır.

KAYNAKLAR

1. Fejzo MS, Slamon DJ. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins. *Am J Pathol* 2001; 159: 1645-1650.
2. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4(7): 844-847.
3. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 657-662.
4. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154(4): 981-986.
5. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 1966-75.
6. Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(20): 1758-1764.
7. Richter J, Wagner U, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 2000; 157(3): 787-794.
8. Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, et al. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 2000; 60(23): 6617-6622.
9. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; 80: 1943-1949.
10. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412: 822-826.
11. Bubendorf L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol* 2001; 40(2): 231-238.
12. Wester K, Asplund A, Backvall H, Micke P, Derveniace A, Hartmane I, et al. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Lab Invest* 2003; 83(6): 889-899.
13. Dan HL, Zhang YL, Zhang Y, Wang YD, Lai ZS, Yang YJ, et al. A novel method for preparation of tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2004; 10(4): 579-82.
14. Rassidakis GZ, Jones D, Thomaidas A, Sen F, Lai R, Cabanillas F, et al. Apoptotic rate in peripheral T-cell lymphomas. A study using a tissue microarray with validation on full tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(3): 328-34.
15. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999; 59(4): 803-806.
16. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001; 81(10): 1331-1338.
17. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 2001; 8 (1): 14-20.