

AKIM SİTOMETRİ VE KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERLERİNDEKİ PROGNOSTİK ÖNEMİ

Y.Doç. Dr. Serap Hastürk

ÖZET: Malignitelere hücre DNA içeriğini incelemek üzere akım sitometrinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Arşiv materyallerinin incelenmesini sağlayan yeni tekniklerin geliştirilmesi, çeşitli malignitelere hücrenin anormal DNA içeriği ya da proliferasyon özelliği ile hastalığın prognozu arasındaki bağlantıyı netleştirmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (KHOAK), tanı ve tedavide hastalığın evresi hala en önemli prognostik faktördür. Gene de evrelendirme ile tedavi sonrası lokal nüks ya da uzak metastaz riskinde olan hastaları belirlemek mümkün değildir. Yüksek ya da düşük riskteki KHOAK'lı hastalar anormal DNA içeriği ile ayırd edilebilir. Tümör hücre siklus analizlerinin yorumu kesin olmasa da, bu özelliklerin prognostik önemi olabilir. Gene de klinik yorumda akım sitometrik DNA incelemesiyle genelleme yapılamaz, KHOAK'de her bir hasta için anormal DNA histogramının prognostik önemi bu konuyla ilgili verilere göre değerlendirilmelidir. Bu yazıda küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde akım sitometri ile belirlenen DNA içeriğinin prognostik önemine ait literatür verileri incelenmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prognostik faktör, akım sitometri, DNA içeriği.

SUMMARY: FLOW CYOMETRY AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER. The use of flow cytometry to analyze the cellular DNA content of human malignancies has become increasingly commonplace. The relationship between abnormalities in DNA content or proliferative characteristics and prognosis is becoming clear for a variety of malignancies in part through new techniques that permit analysis of archival material. For patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), the stage of disease at diagnosis and treatment still stays as the most important prognostic factor. However, within a staging group there is no means of determining which patients are at risk of local recurrence or distant metastases after therapy. High and low risk groups of patients with non-small cell lung cancer can be distinguished on the basis of abnormal stamline DNA content. Though the interpretation of tumor cell cycle analysis is less certain, this characteristics may also be prognostically important. However, generalizations cannot be made when applying flow cytometric DNA analysis to clinical decision. The prognostic importance of an abnormal DNA histogram for an individual patient must be assessed on the basis of the relevant data base for non small cell lung cancer. The current extent of this data base for non small cell lung cancer is reviewed.

KEY WORDS: Non-small cell lung cancer, prognostic factor, flow cytometry, DNA content.

GİRİŞ

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (KHOAK) farklı biyolojik, morfolojik ve klinik özellikte tümörleri içeren heterojen bir gruptur. Son 20 yılda tanı ve tedavideki tüm ilerlemelere rağmen hastalığın prognozunda ve mortalite oranında önemli bir değişim görülmemektedir (1). Bugüne kadar yaşam seyirini belirlemede kullanılan en önemli faktör hastalığın evresidir. TNM'ye göre hastalığın evresi tümörün hacmini, lokalizasyonunu, toraks içi lenf noduna ve uzak organa metastazını gösterir (2). Histolojik tiplendirme ek prognostik bilgi sağlarsa da histolojik grade evre I'de önemlidir. Daha ileri evrelerde prognoza etkisi azdır (3,4,5). İleri evre hastalıkta (evre III-IV) ise tedavi öncesinde tümörün evresi, hastanın performansı ve kilo kaybı prognoza etkili en önemli faktörlerdir, histolojik tipin belirleyiciliği azdır (3,4). Aynı evre ve aynı histolojik tipe sahip KHOAK'leri arasında beklenen yaşam süresinin oranı da çok düşüktür. Örneğin; evre I epidermoid karsinomlu hastalarda tüm iyi prognostik özelliklere rağmen radikal operasyon sonrası 5 yıllık yaşam oranı % 50-60'ı geçmemektedir (2).

Yeni tedavi modelleri belirlemek hastalığın doğal seyri, biyolojik davranışını ve prognozunu daha iyi anlamayı gerektirir. Kemoterapik ajanlara direnç, tümörün yayılma özelliği, hücre proliferasyon hızı ve metastatik potansiyeli gibi genetik bilgiler tümörün DNA'sında kayıtlıdır. Normalden fazla kromozom içeren anöploid tümörlerdeki genler bu tümöral gelişim ve metastatik modelden sorumlu olabilir. Bu nedenle KHOAK'li hastalarda evrelendirme dışında prognozu belirleyecek nükleer özellikleri gösteren faktörlere gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Bu yazının amacı, son zamanlarda tek tek hastaların yönlendirilmesinde değerli prognostik bilgileri verebileceği düşünülen akım sitometri ile KHOAK'li hastaların tümörlerinde DNA içeriğini araştıran çalışmaları incelemektir.

Akım Sitometri

Akım sitometri ile solid tümörlerin DNA analizi son 15 yıldır çalışılmaktadır. Sitometri, hücrelerin ya da diğer biyolojik partiküllerin fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. Akım sitometride bu ölçüm bir sıvı demeti içinden hücrelerin ya da partiküllerin tek tek geçirilmesi ile yapılır. Hücre ya da partiküller üzerine lazer ile farklı dalga boyları ve farklı renklerdeki floresans boyaları gönderilerek sağlanan ışık yansımalarının özel dedektörler ile saptanması, optik ve elektronik sistemlerle elde edilen bu sinyallerin daha sonra bilgisayarlarla analiz edilmesi esasına dayanır. Ölçülmek istenen özelliğe göre (hücre şekli, DNA ya da RNA içeriği, kromatin yapısı vb.) farklı antikorlar ya da boyalar kullanılarak onkoloji, immünoloji, kanser biyolojisi gibi değişik alanlarda kullanımı mümkündür. Sıklıkla hücre veya çekirdekten DNA içeriğini ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. İlk olarak 1960'lı yıllarda çalışmaya başlanmış ancak daha sonra teknolojik gelişme ile klinikte yaygın kullanım olanakları bulunmuştur (1,6-8).

DNA Histogramına Ait Tanımlamalar

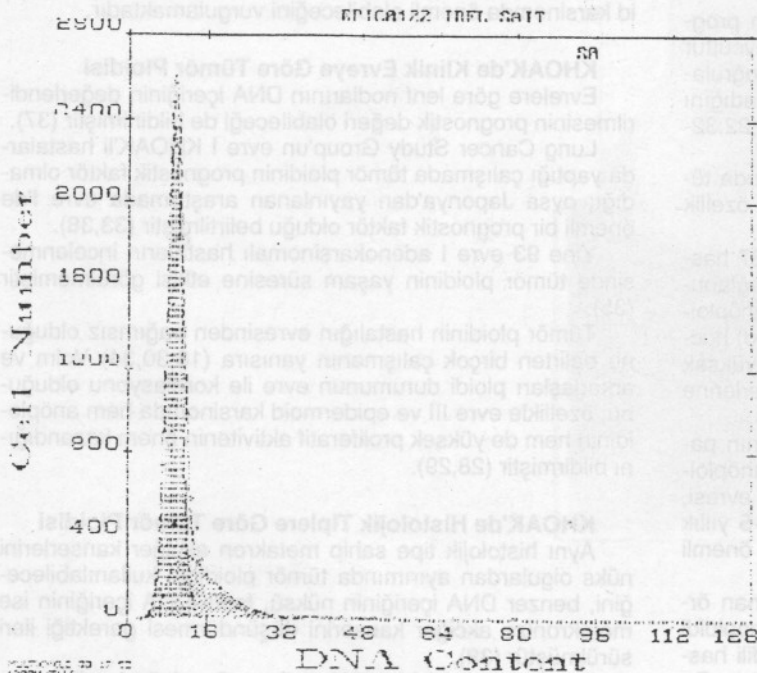
Akım sitometri ile tümör hücresinin DNA içeriği incelenerek tümörün ploidi durumu ve proliferatif indeksinin nicel tesbiti kısa sürede mümkün olmaktadır. Tümör ploidi, malign olmayan hücrenin G0/G1 fazına göre malign hücrenin G0/G1 fazındaki DNA içeriğiyle belirlenir. Tümör hücresinin DNA içeriği normal referans hücreden farklı değilse diploid (Şekil 1), farklı ise anöploidir (Şekil 2). Tümör hücrelerinin G0/G1 fazındaki ortalama DNA içeriğinin normal hücrenin G0/G1 fazındaki ortalama DNA içeriğine sayısal oranı ise DNA indeksidir (DI) (1,9). Hücre siklusunun farklı kompartmanlarındaki tümör hücrelerinin dağılımı da DNA histogramından hesaplanabilir. Bazı araştırmacılar S faz fraksiyonunu tümörün kinetik özelliği olarak tanımlarken, diğerleri proliferatif aktive ya da proliferatif indeksi (PI) S ve G2 M fazındaki toplam hücrelerin yüzdesi olarak kabul etmektedir.

Anormal DNA içeriği ya da anöploidi solid tümörlerin yaklaşık % 70'inde mevcuttur ve pek çok malignitede önemli prognostik özellikleri gösterir (10).

Tümör Ploidinin Değerlendirilmesi

Ancak anöploid hücre popülasyonunun bulunması malign lezyonun patognomonik özelliği olarak yorumlanmamalıdır. Benign lezyonların da anöploidi gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle tüm lezyonların tanısı genel klinik, patolojik ve radyolojik özelliklere oturtulmalıdır. Bunun gibi malign lezyonlarda da anöploidinin bulunmaması benign olarak yorumlanmamasını gerektirir (8,11,12). Ancak benign lezyonlarda anöploid hücre popülasyonu, proliferasyonun çok sık olduğunu, lezyonun premalign olduğunu düşündürülebilir.

Akım sitometri ile yapılan çalışmaların en ilgi çekici yanı ve potansiyel önemi tümör ploidi ya da proliferatif aktivitenin prognozu önemli ölçüde etkileyebileceğinin bildirilmesidir (1,8,9,13,14). Her ne kadar ilk çalışmalarda klinik evre ya da histolojik grade gibi prognostik faktörlerle tümör ploidi özellikleri karşılaştırılmışsa da sonraki çalışmalarda tümör ploidi ve proliferatif aktivitenin direkt olarak her bir hastanın klinik seyriyle uyumlu olduğu gösterilmiştir. Meme, kolon, rektum kanseri gibi birçok malignitede anöploid tümörülerde hastaliksız ve total yaşam sürelerinin kısa, tersine diploid tümörlü hastaların anöploid olanlardan daha iyi bir prognoza sahip olduğu konusunda fikir birliği mevcuttur (15). Bu durumda anöploidinin prognostik belirleyiciliği nüks riski daha yüksek, yaşam süresi kısa, ya da hızlı progressif hastalığı düşündürmesidir. Oysa nöroblastoma, medullablastoma ve çocukluk çağı ALL'de anöploidi iyi prognozu göstermektedir (11,16). Bu nedenle prognozu belirlemede anöploidinin öneminin tesbiti gereklidir. Bu, özellikle premalign lezyonlarda değerlidir. Örneğin akciğer kanserinde metaplazik lezyonlarda anöploidinin görülmesi yakın izlemi ya da profilaktif tedaviyi yönlendirici olabilir.



Şekil 1. Diploid tümörlü hastanın histogram örneği.

Farklı Doku Örneklerinde Değerlendirme

Literatürde KHOAK'li hastalarda akım sitometri ile tümör ploidi tespit ederek prognostik önemini değerlendiren pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda tümörlerde anöploidi görülme sıklığı çok geniş bir aralıkta yer almaktadır. KHOAK için bildirilen tümör anöploidi oranı % 33'ten % 96'ya kadar değişmektedir (4,17-21).

En düşük oran Liewald ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Taze doku örneğinde çalıştıkları 30 hastada anöploidi oranı % 38, epidermoid karsinomda % 33, adenokarsinomda ise % 80 olarak bulunmuştur (18). Oysa Tirindelli-Danesi ve arkadaşları gene taze doku ile 101 hastada % 96 oranında anöploidi tespit ettiklerini bildirmiştir (19).

Bu farklılık muhtemelen çalışılan doku örneğinin niteliği (taze doku-parafin blok), örnek alma yöntemlerinin değişikliği (cerrahi örnek ya da diğerleri), hastalığın evresi, histolojik tipleri, aynı tümörden alınan örneklem sayısı ile ilgilidir. Tümör hücrelerinde DNA içeriğini inceleyen ilk çalışmalar taze dokudan alınan hücre süspansiyonları gerektirmekteydi. Daha sonraları Hedley ve arkadaşları akım sitometrik DNA analizi için parafin bloklardan nükleusları ayırma tekniğini geliştirmişlerdir (10). Böylece hastaların uzun süre izlenimi ile ilgili karşılaştırmalar mümkün olmuştur.

Parafin blok ya da taze dokudan yapılan çalışmaların birbirlerine göre farklı avantajları mevcuttur. Prospektif çalışmalarda hastaliksız ya da tüm yaşam sürelerinin analizleri uzun yıllar gerektirirken, parafin bloklardan retrospektif çalışma ile bu sorun ortadan kalkmaktadır. Ayrıca taze doku örneğinde tanısal olarak yeterli hücre bulunduğundan patolojik hiçbir zaman emin olamaz; oysa parafin blokta malign dokuyu gördüğü kesitten çalışması mümkün olmaktadır (8,10,12).

Buna karşın parafinli dokunun incelemesi taze dokuya göre bazı kısıtlamalar gösterir. Formalin fiksasyonu boyalı nükleusun DNA floresansında önemli ölçüde azalmaya neden olur. Parafinden çözülen örnekler taze dokuya göre daha fazla döküntü içerir ve histogramların kalitesi kötüleşir. Bu faktörler parafin bloktan hücre siklus incelemelerini taze dokuya göre daha az güvenli kılar. Diğer bir önemli kısıtlama da parafin bloktan dokuyu ayırmada sadece nükleusların elde edilebilmesidir. Sitoplazma ve plazma membranı örnek hazırlanımı sırasında kaybolur. Bu da hücrenin özelliklerini değerlendirebilme sınırlarını önemli ölçüde daraltır (9,10). Gene de nükleus dışı bazı parametrelerin ölçümünün mümkün olduğunu bildiren çalışmalarda mevcuttur (10).

Akım sitometri ile elde edilen DNA histogramlarının kalitesi DNA piklerinin değişim katsayısı (DK) [Coefficient of variation = CV] ile belirlenir (1213). Genellikle insan solid tümörlerinde DK'nın % 2-5 arasında olması gerektiği kabul edilmektedir (12). Ancak parafinli bloklarda debrisin çokluğu nedeniyle daha büyük oranlar (% 7.6-10) görülmektedir (10,21,22).

Bütün bu farklılıklara rağmen aynı tümörden alınan taze doku ve parafinli blokların akım sitometrik analizlerinin karşılaştırıldığı pek çok çalışmada her iki örnekteki tümör ploidi sonuçlarının birbirine uyumlu olduğu gösterilmiştir (8,9,10,23). Literatürde mevcut araştırmaların çoğunda parafin bloklar kullanılmıştır.

Tümörlerin DNA analizleri genellikle cerrahi olarak çıkarılan doku örneklerinde çalışılmakta-

dır. Ancak ince iğne aspirasyon biyopsisi ya da hücre dökülmesiyle sağlanan sitolojik doku örnekleri de DNA analizi için bir diğer kaynaktır. Parafinli bloklarla ince iğne aspirasyonu arasında DNA analizinin uyumu mükemmel olarak bildirilmektedir (24). İğne neoplastik dokuyu seçici olarak örneklediğinden, ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) anöploid hücre popülasyonunu göstermede daha duyarlı olabilir (11,24). Ayrıca doku örneği olarak plevral effüzyonlar, balgam, bronş lavajı, bronkoalveolar lavaj (BAL), bronkoskopik biyopsi de kullanılmaktadır (10). Bronkoskopik biyopsilerden cerrahi örneklerle uyumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (25).

Tümöral Heterojenite

KHOAK'inde DNA incelemeleri çoğunlukla her bir tümörden sadece bir örneğin tetkikine dayanmaktadır. DNA incelemesinde teknik ve yorumsal farklılıkların yanı sıra, DNA içeriğinin tümör içerisinde de değişimler gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Tümör hücresinin heterojenitesi kanser biyolojisinin temel konularındandır. DNA içeriğinin tümör içerisinde değişiklikler gösterdiği meme, böbrek, kolon ve over kanserlerinde gösterilmiştir (12,13,15). Yine aynı lezyonun farklı topografik alanları arasında histopatolojik görünümde değişimlerin olması akciğer kanserinin bilinen özelliğidir. Carey ve arkadaşları inceledikleri akciğer tümörlerinin % 90'ında DNA içeriğinde heterojenite tesbit etmişlerdir (26). Tirindelli-Danesi ve arkadaşlarının çalışmasında bu oran % 62, bir başka çalışmada ise % 14'tür (19,27). Son çalışmada bu oranın düşüklüğü, yani DNA ploidiindeki stabilite İİAB'nin kullanımına, örneklerin tümörün merkezinden değil de kenarlarından alınmasına ve taze doku örneklerinin kullanımına bağlanmıştır.

KHOAK'de Tümör Ploidinin Prognostik Değeri

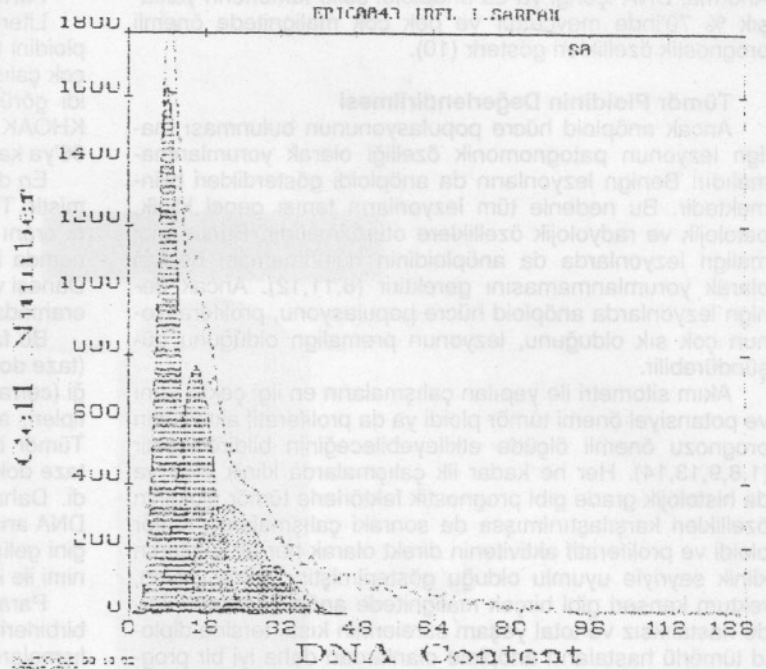
KHOAK'lerinde akım sitometri ile DNA analizinin prognostik değer taşıdığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (17,19,20,28-31). Ancak tüm çalışmalar bu görüşü doğrulamamaktadır. Bunların aksine, böyle bir bağlantı olmadığını bildiren çalışmalar da literatürde yer almaktadır (14,22,32-36).

Bunn ve arkadaşları 40 hasta içeren çalışmalarında tümör ploidiinin yaşam süresi üzerinde belirleyici bir özellik göstermediğini bildirmiştir (14).

İlk kez 1985'de Volm ve arkadaşları KHOAK'li 187 hastada tümör ploidi ve proliferatif aktivitenin klinik ile bağlantısını tanımlamışlardır (17). Örneklerinin % 83'ünde anöploid, bunların % 25'inde birden fazla anöploid (multiploid) hücre bildirmişlerdir. Beş yıllık izlenimde anöploid ve yüksek proliferatif aktiviteli hastaların yaşam sürelerini diğerlerine göre önemli ölçüde daha kısa bulmuşlardır (29).

Zimmerman ve arkadaşları 100 KHOAK'li hastanın parafin bloklarından yaptıkları çalışmalarında, 45'inde anöploid tespit etmişlerdir. Tümör ploidi ile hastanın yaşı, evresi, tümörün histolojisi arasında bağlantı görülmemiş; 2-5 yıllık klinik izlenimde ploidi durumunun bu hastalarda en önemli bağımsız prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (30).

Bir başka çalışmada 83 KHOAK'li hastadan alınan örneklerin incelenmesi ile 1 yıllık yaşam oranının hipoploidi ya da hiperploidiili hastalarda, diploidi hatta anöploidili hastalardan önemli ölçüde daha kötü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda da tümör ploidiinin klinik evre ya da tümör his-



Şekil 2. Anaploid tümörlü bastanın histogram örneği.

tolojisinden bağımsız olduğu belirtilmiştir (19). Isobe ve arkadaşlarının 130' hastalı serilerinde 310 parafin blok incele-nerek diploid tümörlü hastaların yaşam süresinin daha uzun olduğu ve DNA içeriğinin önemli bir prognostik faktör olduğu görülmüştür (20).

Ten Velde ve arkadaşları ise 67 parafin bloktan KHOAK'li tümör örneği çalışarak ploidi durumu ile yaşam süresi arasında bir bağlantı bulunmadığını bildirmişlerdir (32). Bu çalışmada yazarlar proliferatif aktivitenin özellikle epidermoid karsinomda önemli olabileceğini vurgulamaktadır.

KHOAK'de Klinik Evreye Göre Tümör Ploidisi

Evrelere göre lenf nodlarının DNA içeriğinin değerlendirilmesinin prognostik değeri olabileceği de bildirilmiştir (37).

Lung Cancer Study Group'un evre I KHOAK'li hastalarda yaptığı çalışmada tümör ploidiinin prognostik faktör olmadığı; oysa Japonya'dan yayınlanan araştırmada evre I'de önemli bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (33,38).

Yine 93 evre I adenokarsinomali hastaların incelenmesinde tümör ploidiinin yaşam süresine etkisi görülmemiştir (35).

Tümör ploidiinin hastalığın evresinden bağımsız olduğunu belirten birçok çalışmanın yanı sıra (18,30,34) Volm ve arkadaşları ploidi durumunun evre ile korelasyonu olduğunu; özellikle evre III ve epidermoid karsinomda hem anöploidinin hem de yüksek proliferatif aktivitenin önem kazandığını bildirmiştir (28,29).

KHOAK'de Histolojik Tiplere Göre Tümör Ploidisi

Aynı histolojik tipe sahip metakron akciğer kanserlerini nüks olgulardan ayırımında tümör ploidiinin kullanılabileceğini, benzer DNA içeriğinin nüksü, farklı DNA içeriğinin ise metakronize akciğer kanserini düşündürmesi gerektiği ileri sürülmüştür (39).

Tümör ploidiisini histolojik tiplere göre değerlendiren çalışmaların sonuçları da farklılık göstermektedir. Pek çok ça-

İşmada adenokarsinomada anöploid tümör popülasyonu, epidermoid karsinomdan daha yüksek olmasına rağmen yaşam süresi ile bağlantısı gösterilememiştir (20,21,40,41). Şahin ve arkadaşları çalışmalarında genel olarak KHOAK'li hastalarda DNA ploidinin klinik sonuçla bağlantısı olmadığı, epidermoid karsinomlu hastalarda ise ploidinin önemli bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (21). Volm ve arkadaşlarının ploidinin önemini vurgulayan çalışmalarında hastaların önemli bir kısmı epidermoid karsinomdur (17,29). Sadece epidermoid karsinomu içeren çalışmalarında ise ploidin önemi özellikle vurgulanmıştır (40).

Pür adenokarsinomlu 46 hasta ile yapılan bir çalışma anöploidinin prognostik önemi olduğunu ve daha yüksek nüks riski taşıdığını ileri sürmektedir (22). Miyomato ve arkadaşları da anöploidinin adenokarsinomada epidermoid karsinomdan yüksek oranda bulunduğunu, ancak sadece epidermoid grupta prognozu belirlediğini bildirmiştir (41). Sadece evre I epidermoid karsinomlu 52 hastanın 6 yıl izlendiği bir çalışmada ise tümör ploidinin prognostik önemi olmadığı, yaşam süresinde etkinliğinin görülmediği bildirilmiştir (42). Çeşitli evre ve histolojileri karşılaştıran çalışmalarda gerek evre, gerek histolojik alt grupla bağlantı görülmeyişi gibi yaşam süresine etkinliği de tespit edilememiştir (34,36,43,44).

Gene birçok çalışmada DNA ploidinden ziyade proliferatif aktivitenin yüksek olduğu tümörlerde yaşam süresinin daha kısa olduğu ileri sürülmektedir (17,29,32,34,40,45). Tedavi modellerine göre de nüks riski ile tümör ploidinin bağlantısı gösterilememiştir (36,46).

SONUÇ

Bütün bu çalışmalar değerlendirildiğinde KHOAK'li hastalarda akım sitometri ile DNA analizinin, proliferatif aktivitenin hastaların nüks riskini ve yaşam süresini belirlemedeki etkilerini yorumlamak çok güç olmaktadır. Akım sitometri ile DNA içeriğinin incelenmesi hızlı, tekrarlanabilir, nicel bir tetkiktir. Donmuş taze doku ya da parafinli blokların incelenmesinde geliştirilen tekniklerle çalışmalar giderek daha kolay olmaktadır. Solid tümörlerde hücrelerin yüzey belirteçleri, tümöre eşlik eden antijenler, onkogenler vs. araştırılabilir (1,8,12). Akım sitometrik bulgular immünohistokimyasal tetkiklerle birleştirilebilmektedir (47).

Mortalitesi oldukça yüksek olan KHOAK'inde akım sitometri ile belirlenen özelliklerin hastalığın tanısı ve seyrindeki yerinin net olarak belirlenmesi profilaktik ve radikal tedavi modellerinde önemli gelişmelere yol açabilir. Ayrıca hastaların izleniminde diploid özellikteki lezyonların anöploid nitelik kazanması ya da tam tersinin gelişimi klinisyene, kolay elde edilen sitolojik örneklerle, kolay bir tetkik olarak DNA analizini kullanma olanağı sağlayabilir. Bu nedenle KHOAK'inde akım sitometri ile DNA analizlerinin geniş serilerle tekrarlanması gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Barlogie B., Raber M.N., Schumann J., et al: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.* 1983; 43: 3982.
- Shields T.W.: Surgical therapy for carcinoma of the lung. *Clin Chest Med.* 1993; 14: 121.
- Buccheri G., Ferrigno D.: Prognostic factors in lung cancer: Tables and comments. *Eur Respir J.* 1994; 7: 1350.
- Ginsberg R.J., Kris M.G., Armstrong J.G.: Cancer of the lung. In Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer principles and practice of oncology*. Philadelphia. JP Lippincott Company. 1993; p: 673.
- Ries L.A.: Influence of extent of disease, histology and demographic factors on lung cancer survival in the SEER population-based data. *Semin Surg Oncol.* 1994; 10: 21.
- Rosai J.: Principles on oncologic pathology. In Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer principles and practice of oncology*. Philadelphia. JB Lippincott Company. 1993; p: 228.
- Shapiro H.M.: Flow cytometry: Past, present, and future. In Coon JS, Weinstein RS (eds). *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore, Williams and Wilkins. 1991; p: 1.
- Coon J.S., Landay A.L., Weinstein R.S.: Biology of disease. *Advances in flow cytometry for diagnostic pathology*. Lab Invest. 1987; 57: 453.
- Merkel D.E., McGuire W.L.: Ploidy, proliferative activity and prognosis. *DNA flow cytometry of solid tumors*. Cancer. 1990; 65: 1194.
- Coon J.S., Weinstein R.S.: Evaluation of solid tumors by flow cytometry: Methods and interpretation. In Coon JS, Weinstein RS (eds) *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore, Williams and Wilkins. 1991; p: 115.
- Herman C.J., Wallock J.: DNA analysis of solid tumors: Practical value. In Coon JS, Weinstein RS (eds). *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore, Williams and Wilkins. 1991; p: 135.
- Koss L.G., Czerniak B., Herz F., Wersto R.P.: Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol.* 1989; 20: 528.
- Merkel D.E., Dressler L.G., McGuire W.L.: Flow cytometry, cellular DNA content and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 1690.
- Bunn P.A., Carney D.N., Gazdar A.F., et al: Diagnostic and biologic implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res.* 1983; 43: 5026.
- Williams N.N., Daly J.M.: Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. *Surg Gynecol Obst.* 1990; 171: 257.
- Pui C.H., Williams D.L., Raimondi S.C., et al: Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1987; 70: 247.
- Tirindelli-Danesi D., Teodori L., Mauro F., et al: Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. A 5 year study. *Cancer.* 1987; 60: 844.
- Volm M., Drings P., Mattern J., et al: Prognostic significance of DNA patterns and resistance-predictive tests in non-small cell lung carcinoma. *Cancer.* 1985; 56: 1396.
- Liewald F., Demmel N., Wirkisch R., Kahle H., Valet G.: Intracellular pH, esterase activity, and DNA measurements of human lung carcinomas by flow cytometry. *Cytometry.* 1990; 11: 341.
- Isobe H., Miyamoto H., Shimizu T., et al: Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer.* 1990; 65: 1391.
- Şahin A.A., Ro J.Y., El Naggar A.K., et al: Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. *Cancer.* 1990; 65: 530.
- Asamura H., Nakajima T., Mukai K., Shimosato Y.: Nuclear DNA content by cytofluorometry of stage I adenocarcinoma of the lung in relation to post-operative recurrence. *Chest.* 1989; 96: 312.
- Camplejohn R.S., Macartney J.C.: Comparison from DNA flow cytometry from fresh and paraffin embedded samples of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol.* 1985; 38: 1096.
- Greenbaum E., Koss L.G., Sherman A.B., Elequin F.: Comparison of needle aspiration and solid biopsy techniques in the flow cytometric study of DNA distribution of surgically resected tumors. *Am J Clin Pathol.* 1984; 82: 559.
- Haneda H., Miyamoto H., Isobe H., et al: Accuracy of the bronchoscopic DNA content analysis of non-small cell lung carcinoma. *J Surg Oncol.* 1989; 49: 182.
- Carey F.A., Lamb D., Bird C.C.: Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer.* 1990; 65: 2266.
- Sara A., El Naggar A.K.: Intratumoral DNA content variability. A study of non-small cell lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 1991; 96: 311.
- Volm M., Mattern J., Sonka J., et al: DNA distribution of non-small cell lung carcinomas and its relationship to clinical behavior. *Cytometry.* 1985; 6: 348.
- Volm M., Hahn E.W., Mattern J., Vogt-Maykopf I., Weber E.: Five year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1988; 48: 2923.
- Zimmerman P.V., Hawson G.A.T., Bint M.H., Parsons P.G.: Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet.* 1987; 2: 530.
- Salvati F., Teodori L., Gagliardi L., Signora M., Aquilini M., Stornello G.: DNA flow cytometric studies of 66 human lung tumors analyzed before treatment. Prognostic implications. *Chest.* 1989; 96: 1092.
- Ten Velde G.P.M., Schutte B., Vermeulen A., Volovics A., Reyniers M.M.J., Blijham G.H.: Flow cytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; 24: 455.
- Schmidt R.A., Rush V.W., Piantadosi A.: A flow cytometric study of non-small cell lung cancer classified as T1N0. *Cancer.* 1992; 69: 78.
- Pence J.C., Kerns B.M., Dodge R.K., Iglerhart D.: Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small cell lung can-

- cer. Arch Surg. 1993; 128: 1382.
35. Cibas E.S., Melamed M.R., Zaman M.B., Kimmel M.: The effect of tumor size and tumor cell DNA content on the survival of patients with stage I adenocarcinoma of the lung. Cancer. 1989; 63: 1552.
36. Ojala A., Kallioniemi O.P., Wigren T., Kallioniemi A., Mattila J., Lehtinen M., Koivula T.: Flow cytometric analysis of tumour DNA profile related to response to radiotherapy and survival in inoperable lung cancer. Acta Oncologia. 1990; 29: 983.
37. Ogawa J., Iwazaki M., Tsurumi T., Inoue H., Shohtsu A.: Prognostic implications of DNA histogram, DNA content and histologic changes of regional lymph nodes in patients with lung cancer. Cancer. 1991; 67: 1370.
38. Ichinose Y., Hara N., Ohta M., Yano T., Maed K., Asoh H., Katsuda Y.: Is T factor of the TNM staging system a predominant prognostic factor in pathologic stage I non-small cell lung cancer? J Thorac Cardiovasc Surg. 1993; 106: 90.
39. Ichinose Y., Hara N., Ohta M., Kuda T., Asoh H., Chikama H.: DNA diploidy patterns of tumors diagnosed as metachronous or recurrent lung cancer. Ann Thorac Surg. 1991; 52: 469.
40. Volm M., Mattern J., Müller T., Drings P.: Flow cytometry of epidermoid lung carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five-year follow-up study. Anticancer Res. 1988; 8: 105.
41. Miyamoto H., Harada M., Isobe H., et al: Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. Cancer Res. 1991; 51: 6346.
42. Van Bodegom P.C., Baak J.P.A., Galen C.S., Schipper N.W., Wisse-Brekemans E.C.M., Vanderschueren R.G.J.R.A., Wagenaar S.S.C.: The percentage of aneuploid cells is significantly correlated with survival in accurately staged patients with stage I resected squamous cell lung cancer and long-term follow-up. Cancer. 1989; 63: 143.
43. Carp N.Z., Ellison D.D., Brophy P.F., Watts P., Chang M.C., Keller S.M.: DNA content in correlation with postsurgical stage in non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 1992; 53: 680.
44. Rice T.W., Bauer T.W., Gehpardt G.N., et al: Prognostic significance of flow cytometry in non-small lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg. 1993; 106: 210.
45. Dazzi H., Thatcher N., Hasleton P.S., Swindell R.: DNA analysis by flow cytometry in non-small cell lung cancer: Relationship to epidermal growth factor receptor, histology, tumour stage and survival. Respiratory Medicine. 1990; 84: 217.
46. Ju J., Shaeffer J., Zhu A., et al: Flow cytometric DNA content and clinical outcome in patients with non-small cell lung cancer given postoperative radiation therapy. Cytometry. 1993 ;14: 428.
47. Guber A., Cohen R., Ronah R., et al: Flow cytometric analysis and cyto-keratin typing of human lung tumors. A preliminary study. Chest. 1994; 105: 138.