FLOW CYTOMETRY /AKIM SİTOMETRİSİNİN PATOLOJİDEKİ YERİ

[1]Dr. Mükerrem SAFALI, [2]Dr. Gökhan GEDİKOĞLU, [3]Dr. Bülent CELASUN, [4]Dr. Rıfkı FİNCİ

ÖZET

Akım sitometrisi hücresel DNA içeriği başta olmak üzere hücrenin çekirdek, membran ve sitoplazmasına ait birçok özelliğin değerlendirilmesinde kullanılan modern bir tanı yöntemidir.

Başlangıçta kan hücrelerinin sayılması ve adlandırılmasında kullanılan akım sitometrisi düzeneğinin geliştirilmiş modelleri, patolojide geniş kullanım alanı bulmuştur. Akım sitometrisi patolojide morfolojik incelemenin, tanıya katkısının sınırlı olduğu durumlarda tanı koymada, ayırıcı tanıda, tedavinin planlanması ve prognozun belirlenmesinde önemli katkılar sağlayabilmektedir.

Bu yazıda akım sitometrisinin özellikleri, günümüzdeki kullanımı ve patolojideki yeri ile ilgili bilgiler sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Akım Sitometrisi

SUMMARY

Flow cytometry is a diagnotic method used primarily in the evaluation of cellular DNA content as well as various other nuclear, membraneous or cytoplasmic features of the cell. Flow cytometry has originally been used in the counting and naming of the blood cells. The developed models of the equipment has found widespread utilisation in pathology. This method can make significant contributions in the diagnosis, differential diagnosis, planning of treatment and determination of prognosis where the contribution of morphological evalulation is limited.

In this article the features of the flow cytometry, its current usage and place in pathology is presented.

Key words: Flow Cytometry

GİRİŞ

Patoloji bölümlerinde hastalıklara ışık mikroskopunun, immünhistokimyanın, immünfloresansın ve elektron mikroskopinin sınırları içinde tanı konulmaktadır. Histopatolojik inceleme sonucu aynı tanıyı alan iki ayrı hastanın malign tümörlerinden birinin prognozu diğerlerinden farklı olabilmektedir. Bu farkın önceden belirlenebilmesi, seçilecek cerrahi yöntemden, tedavinin planlanmasına ve hastanın takibine kadar bir çok yaklaşımın daha doğru düzenlenmesini mümkün kılacaktır.

Akım sitometrisi (ASM); başta DNA içeriği olmak üzere, hücrenin çekirdek, membran ve sitoplazmasına ait birçok özelliği (hücre boyutu, yüzey antijenleri, sitoplazmik granülarite gibi) değerlendirerek, hücreyi daha iyi tanımamıza ve özellikle neoplastik olayların biyolojik davranışlarını önceden tahmin edebilmemize yardımcı olan, tanı, prognoz,tedavinin düzenlenmesi ve hastanın takibi açısından anlamlı bilgiler sunan otomatik ve kompüterize bir sistemdir. ASM patologların konvansiyonel yöntemlerle hastalıklara yaklaşımlarına verdiği ek bilgilerle önemli bir destek sağlıyabilecek niteliktedir.

TARİHÇE

Hücreleri tek tek inceleyebilme düşüncesi ışık mikroskopunun geliştirildiği 18. yüzyıla dek dayanırsa da bugünküne yakın anlamda bir ASM düzeneği oluşturulabilmesi için gerekli teknolojilere ancak 1960'lı yıllarda sahip olunabilmiştir. O yıllarda ABD

1 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi, Ankara
2 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanı, Ankara
3 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Anabilim Dalı Yardımcı Doçenti, Ankara
4 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji Anabilim Dalı Profesörü, Ankara

ve Almanya'da geliştirilen prototipler kan hücrelerinin ve küçük hücresel parçacıkların adlandırılmasında kullanılmaktaydı. Sonraki yıllarda bilgisayar, laser, monoklonal antikor teknolojilerinde ve sitokimyadaki hızlı gelişmeler sonucunda hücreleri birçok özellik yönünden inceleyebilen bir sistem oluşturmak mümkün olabilmiştir. Günümüzde ASM dakikada 1000-100000 hücreyi birçok özellik açısından tarayarak, verileri toplayabilen ve analiz eden bir düzenektir. Bu düzenek immünolojiden hematolojiye, onkolojiden patolojiye kadar birçok değişik tıp dalında kullanım alanı bulmuştur(1).

YÖNTEMİN ÖZELLİKLERİ

ASM'nin temel özelliği bir dokuyu oluşturan hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granülarite gibi bazı özelliklerini değerlendirerek incelemeye olanak vermesidir (2, 3). ASM'nin kullanım amacına ve seçilen programa bağlı olarak aynı anda çok sayıda özelliği araştırmak mümkündür.

ASM; benzeri düzeneklerden (statik sitometre, slitscan analiz gibi), kısa sürede çok daha fazla hücreyi, birçok değişken açısından değerlendirip analiz etme özelliği ile ayrılır (4, 5). Çok sayıda hücrenin incelenebilmesi sayesinde istatiksel olarak daha anlamlı ve daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir (4).

ASM teknik olarak, özel olarak işaretlenmiş, tek sıra halinde peşpeşe dizilmiş hücrelerin bir ışın ile karşılaştırılması sonucu oluşturdukları ışımaların önce elektrik sonra digital sinyallere dönüştürülüp kaydedilmesi esasına dayanır (1,2,6).

Tipik bir ASM düzeneği şu dört temel yapıdan oluşur (Şekil 1) (2)

A) Işık kaynağı, B) örnekleme odası ve optik sistem, C) impulsları önce elektronik sonra digital sinyallere dönüştüren sistem, D) Düzeneğin işleyişini, verilerin toplanmasını ve değerlendirilmesini sağlıyan bilgisayar sistemi (2).

Hücreleri işaretlemek için floresan maddeler (florokromlar) (Tablo.1) (2,6), ışın olarak ark lambaları, laserler (sıklıkla argon laser), tarayıcı olarak ve sinyal dönüşümleri için FALS (Forward-angle light

Tablo (I): ASM'DE KULANILAN BOYALAR

BOYA	REAKSİYON YERİ
Propidium iodide	DNA
Ethidium bromide	DNA
Acridine Orange	DNA / RNA
Mithramycin	DNA
DAPI	DNA
Hoescht 33258	DNA
Hoescht 33342	DNA
Pyronin Y	RNA (Mitokondri)
Fluorescein isothiocyanate	Protein antikor etiketleme
Fluorescein diacetate	Sitoplazmada fluoresceine dönüşerek solüsyon oluşturur
Phycoerythrin	Antikor etiketleme
Rhodamine isothiocyanete	Protein
Rhodamine 123	Mitokondri
Fluorescamine	Plazma membranları
4 methylumbelliferyl türevleri	Enzim aktivitesi
Nitroheterocycle bileşikleri	Hipoksik hücreler

(Flow Cytometry: Methodology and Applications in Pathology. Journal of Pathology. Vol: 149 (1986)

scatter detector), dikroik aynalar, filtreler ve photomultiplier tüp detektöründen oluşan bir sistem kullanılır (2, 6). Sonuçlar digital sinyaller halinde bilgisayarda toplanır ve kullanım amacına uygun sayısal verilere (DNA indeksi: Dİ gibi) veya grafiklere (Histogramlar gibi) dönüştürülür. Bu sonuçlar anlamlarını bir uzman tarafından değerlendirildikten sonra kazanırlar.

a) Örneklerin Hazırlanması

ASM ile değerlendirilecek hücre örneklerinin hazırlanması işlemin en önemli aşamalarından biridir. Hücrelerin kohezyon göstermeden tek tek dağılabildikleri bir süspansiyon halinde olmaları şarttır. Kullanılacak örnek cerrahi işlemle elde edilen taze dokulardan, dondurularak saklanmış dokulardan ya da parafinde bloklanmış dokulardan elde edilmiş olabilir (1, 2, 3). Tek hücre dağılımı sağlıyan süspansiyonun hazırlanması için yapılacak işlemler dokunun türüne ve durumuna göre değişiklik gösterirler. Hematopoetik dokular gibi daha az kohezyon gösteren hücrelerden oluşan dokular ayrıştırma, süzme ve şırınga etme aşamalarında daha az sorun yaratırken, epitelyal dokular ve solid yapılar daha koheziv hücrelerden oluştuklarından güçlüklere neden olmakta ve daha fazla enzimatik teknik kullanılmaktadır (1, 2, 3). Yalnızca DNA çalışması yapılacaksa, plazma membranı ve sitoplazma enzimatik bir teknikle ortadan kaldırılabilir (3).

Tesbitli, parafinde bloklanmış dokuların ASM ile incelenmesi son yıllarda başarılmıştır (7). Parafinize dokular, taze dokulara göre bazı avantajlar sağlar. Parafinde bloklanmış dokuların daha önce ışık mikroskobunda incelenme şansı olduğundan tümörün en uygun kısmını doğru şekilde seçmek mümkündür. Taze dokularda yeterli oranda ve doğru örnekleme yapılıp yapılmadığını kontrol etmek ise çok zordur (3, 7). Parafin bloklu dokularla geriye dönük çalışmaların yapılabilmesi laboratuvarların arşivlerindeki bir çok tümörün ASM ile değerlendirilmesine olanak verdiğinden daha kısa sürelerde standart sonuçlara ulaşmak mümkün olabilir (3, 7). Tesbitli parafinize dokularda hücre nükleusları iyi korunduğundan DNA içeriğinin incelenmesi, diğer pek çok parametrenin incelenmesinden daha verimli olabilir (3, 7, 8). Diğer yandan, formalinle fikse edilip parafinde bloklanmış dokuların taze dokulara göre bazı dezavantajları da vardır. Bu dokularda boyanan nükleusların DNA floresansında önceden tahmin edilemeyen ve her hücre için farklılık gösteren önemli azalmalar olabilmektedir (Tablo 2). Bu yüzden DNA içerik ölçümleri sırasında her seferinde bir referans noktası sağlamak amacı ile dış standartlar kullanılmakta, bu da sonuçların karşılaştırılmasında sorunlara yol açmaktadır (2, 3). Bu sorunlar endojen inflamatuar hücreler ve stromal hücrelerin diploid değerleri referans kabul edilerek çözülmeye çalışılır (2, 3). Deparafinizasyon işlemi, incelenecek hücrelerin membranlarının ve stromal elementlerinin zarar görmelerine neden olduğundan, parafinize dokularda hemen yalnızca nükleuslarla ilgili çalışmalar yapılabilmektedir (3, 7, 8).

Tek hücre dağılımı gösteren süspansiyonun hazırlanmasından sonra fiksasyon (çoğu kez etanolle) ve boyama işlemleri yapılmaktadır. Nükleusların boyanmasında en çok kullanılan florokromlar propidyum iodide ve ethidium bromidedir (Tablo 1) (3, 6).

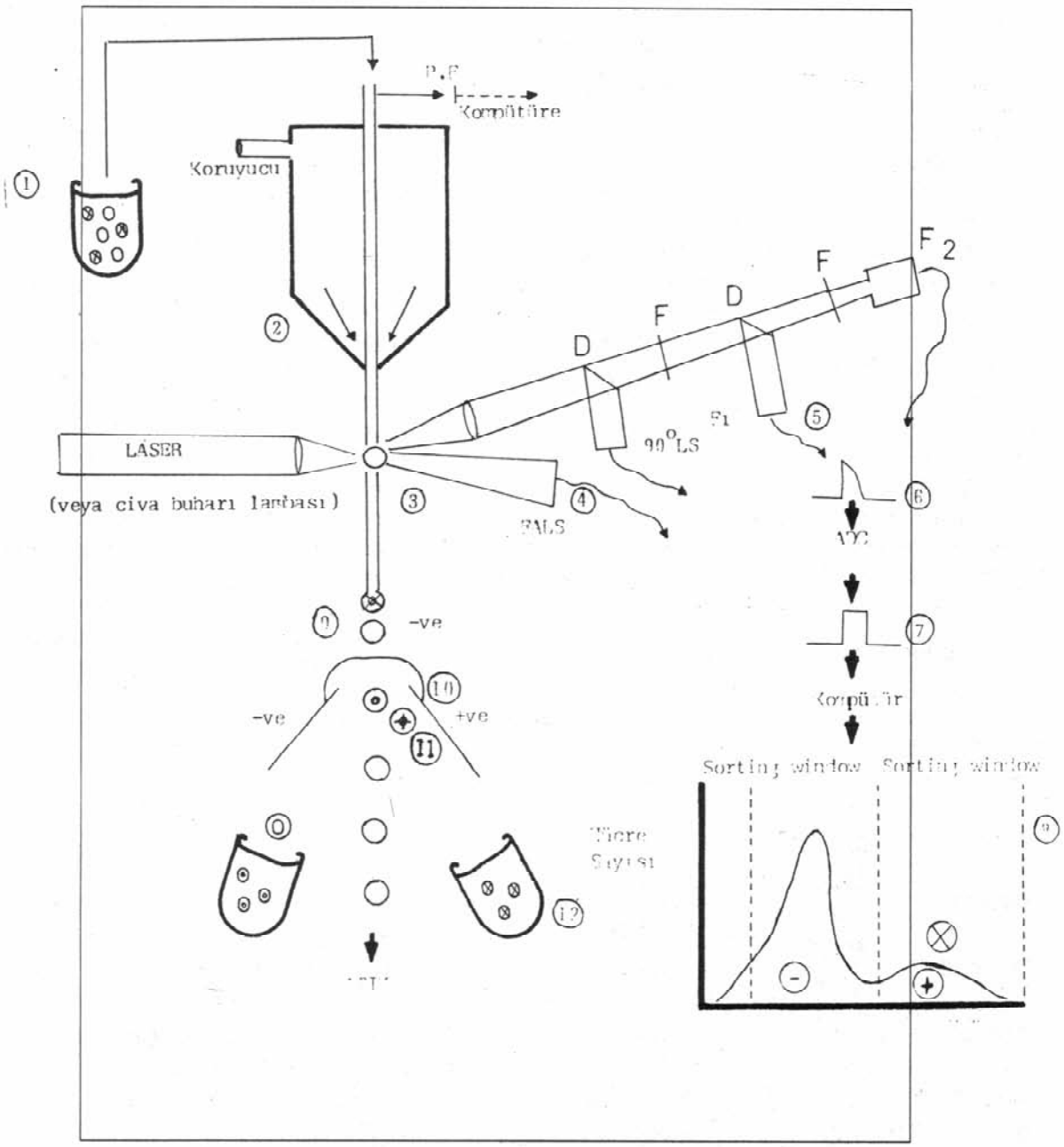
b) ASM Aygıtının Çalışması

Florokromlarla boyanıp izotonik NaCl solüsyo-

Tablo (II): Florokromlar

Florokromlarla boyanan hücreler kazandıkları floresans özellik nedeniyle etkisi altında kaldıkları ışından daha uzun dalga boyuna sahip ikinci bir ışıma yaparlar. ASM'de kullanılan florokromların şu özellikleri taşıması istenir. (2, 3, 4).

1. Hücrenin istenen komponentine yeterli oranda bağlanabilmeli.
2. Hızlı hücresel penetrasyon gösterebilmeli,
3. İstenen komponenti yeterli oranda boyayabilmeli.
4. Yüksek floresans özelliğe sahip olmalı.
5. Floresans maddenin emilim ve tekrar yayılım spektrumu her hücreden gelen sinyali ayrı ayrı değerlendirecek kadar geniş olmalı.



Şekil 1 : ASM düzeneğinin şeması: *(Flow Cyotometry: Methodology and Applicatıons in Pathology Journal of Pathology Vol 149 (1986)*

nunda bekletilen hücreleri içeren süspansiyon ASM aygıtına şırınga edilir. ASM'nin girişi hidrodinamik olarak odaklanmış bir bölgedir ve akımı hücrelerin tek tek incelenmesini sağlıyacak biçimde düzenler (Şekil 1) (2, 6). ❶ ASM aygıtının tüpünde tek sıralı hücre dizileri halinde kayan hücreler ❷ Işık kaynağının etkili olduğu alanda bu ışın tarafından uyarılırlar (2, 6). ❸ Işın kaynağının tam karşısına yansıyan ışınlar hücrenin boyutları hakkında bilgi sağlarken, 90 derecelik kırılımla yansıyan ışınlar hücrenin iç yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlarlar (2, 6). ❹ Gerekli donanım ve polarizasyon filtreleri eklendiğinde hacim ve polarizasyon ölçümleri de yapılabilir. Işınla karşılaştığı bölgede hücreler ikinci ve daha uzun dalga boylu bir ışıma yaparlar (1, 2, 6). Bu ışınlar 90 dereceye yerleştirilmiş detektörle toplanır,

burada farklı dalga boylarını seçme özelliğine sahip dikroik aynalarla ayrıştırılan ışınlar photomultiplier detektörlerce yönlendirilir (6). ❻ Bu ışınlar analoğu olan elektrik sinyallerine dönüştürülür. Işıma anında istenmeyen floresans ve dağılmış ışınlar optik filtrelerce tutulurlar, ❻ bu elektrik sinyaller digital sinyallere çevrilir ❼ ve bilgisayara kaydedilirler. Bu kayıtlar gerektiğinde sayısal veriler veya histogramlar şeklinde değerlendirilirler. ASM düzeneğinin bir başka özelliği de, hücreleri taşıdıkları özelliklere ayrıştırabilme yeteneğidir (sorting window) (2, 6). Uygun programların bilgisayara yüklenmesi sonucu ❽ ASM aygıtının tüpünden geçen hücreler piezoelektrik kristalinin titreşimi ile (+) veya (-) yüklü damlacıklara dönüşür ❾ . (+) veya (-) yük taşıyan bu hücreler yüksek voltajlı iki plaka arasından geçerler ❿ ve taşıdıkları yüke göre de toplayıcı kaplarda birikirler ⓫ ⓬. Böylece, değişik tipte hücreler içeren bir örnekte ASM ile bu hücre tiplerini birbirinden ayırarak homojen hücre grupları elde edip, daha ayrıntılı çalışmalar yapmak mümkün olur (6).

c) Sonuçların Yorumlanması

ASM ile hücreye ait bir çok özellik değerlendirilebilirse de bunlar arasında hücresel DNA içeriğinin belirlenmesinin ayrı bir yeri vardır. Hücre DNA içeriği ölçümü hem patolojiyi daha çok ilgilendiren bir özelliktir, hem de rutin laboratuvarlarda daha kolay uygulanabilir. ASM'de hücre DNA içeriğinin saptanması ile ilgili veriler genellikle histogram denilen grafiklerle gösterilir (Şekil 2) (2, 3, 8). Normal diploid hücrelerde DNA indeksi: 1'dir (Tablo 3) (2, 8, 9). Histogramlar değerlendirilirken G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre miktarına ve bu hücrelerin içerdikleri DNA dağılımlarına bakılır (Şekil 2, 3). Normal diploid hücreler hücre siklusunun farklı fazlarında önceden tahmin edilebilecek sınırlar içinde dağılım gösterirler (2C, 4C gibi) (3, 10). Normal hücreler, içerdikleri DNA miktarı açısından öploid hücreler olduklarından histogramlarda diploidi veya tetraploidi (mitoz sırasında) çevresinde dağılırlar. Halbuki malign hücrelerdeki DNA miktarı normalden daha fazla olduğundan anöploidi eğilimi artmıştır. DNA anöploidisi, incelenen örnekteki ana hücre gruplarından birinin ürettiği DNA içeriğini temsil eder ve normal hücre populasyonunda görülmesi beklenmeyen bir pik oluşumuna neden olur. Histogramda hücre hücre siklusunun S fazı bölümündeki anormal bir pik ise anormal grubunun temsil ettiği tümöral oluşumun proliferasyon aktivitesi hakkında bilgi verir (Şekil 4, 5) (2, 3, 6, 8, 9, 11). DNA anöploidisi, malign neoplazilere genellikle eşlik eder, ancak onların değişmez bir bulgusu değildir. Diploid DNA içeriğine

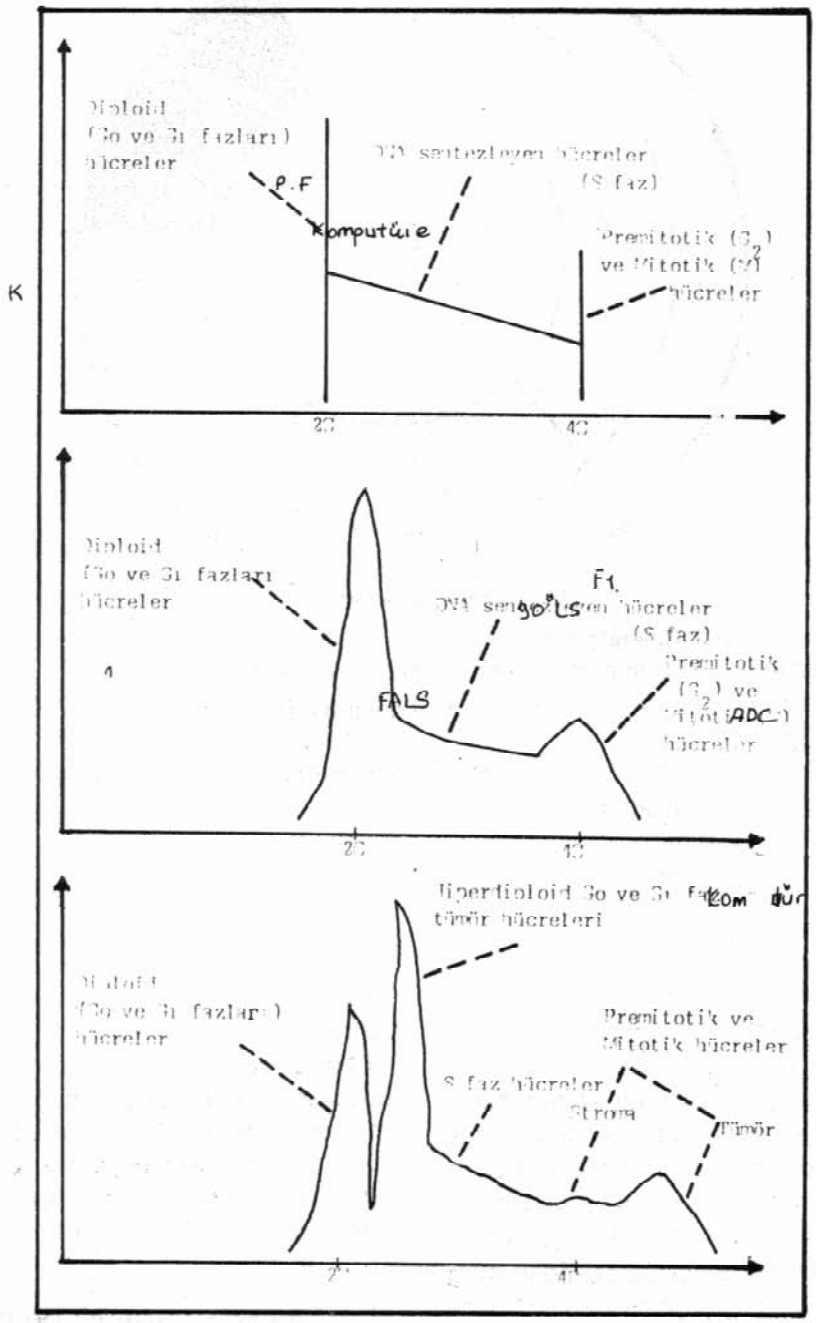
Tablo (III): PLOİDİ

Haploidi	: Mayoz bölünme sonrası gametlerdeki kromozom sayısının 23'e düşmesi (n) haploid sayı ile tanımlanır.
Euploidi	: Haploid sayıdaki kromozomların tam katları euploidi ile tanımlanır. "Diploid (2n), triploid (3n), tetraploid (4n) "
Aneuploidi	: Eğer kromozom sayısı herhangi bir nedenle haploidin tam katları dışında bir sayıya sahip olursa aneuploidi ile tanımlanır. (Hipodiploid, hiperdiploid gibi).
Multiploidi	: Hücrede 2 veya daha fazla DNA stemline bulunması ve ikisinin de DI # 1.0 olması.
DI	: (DNA indeksi) Diploid DNA içeriği DI=1 olarak tanımlanır. (2, 3).

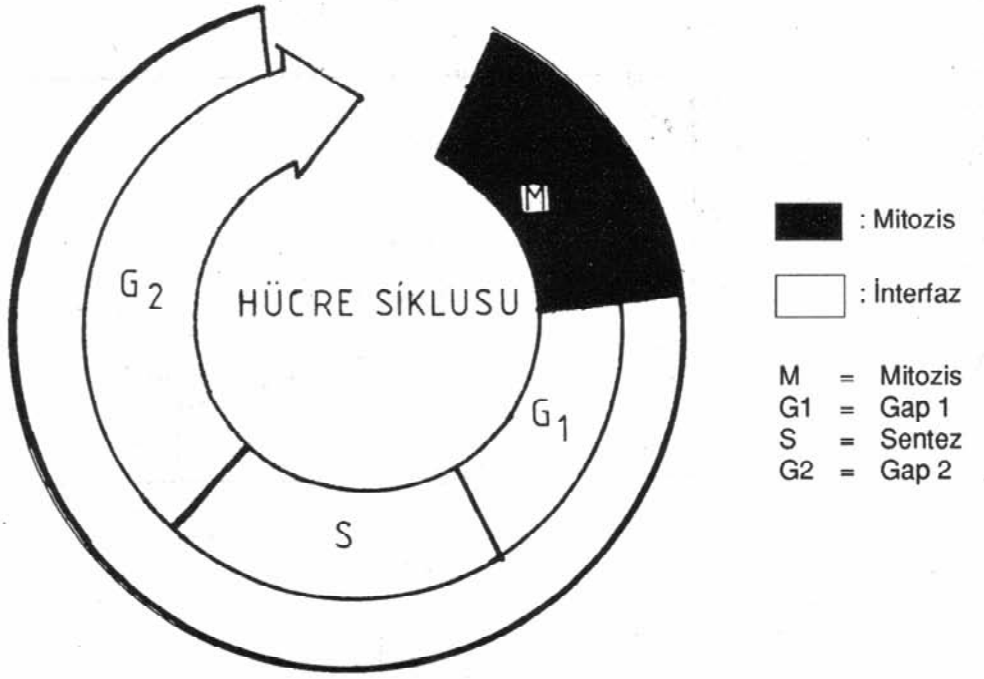
DNA indeksi ile tanımlanan ploidi anormallikleri

Terim	***DI***
Diploid	=1.0
Aneuploid	#1.0
Hipodiploid	<1.0
Hiperdiploid	>1.0
Tetraploid	=2.0

(Ploidy, Proliferative Activity and Prognosis. Cancer 65: 1990)



Şekil II :
Üst: *İdeal DNA içeriği dağılımı.*
Orta: *ASM ile elde edilmiş tipik dağılım.*
Alt: *DNA Aneuploidisi gösteren bir tümörde dağılım (Flow Cytometry of DNA Content and Other Indicators of Proliferative Activity Arch Pathol Lab Med Vol: 113, June, 1989).*



Go= Prolifere olmayan, siklus dışı hücreleri tanımlar.
G_1 (Postmitotik dönem)= RNA ve protein sentezi var DNA sentezi yoktur.
S (Sentez fazı)= DNA sentezi başlar. RNA sentezi devam eder. Protein sentezi maksimumdur.
G_2 (Postsentetik faz)= DNA sentezi tamamlanır. RNA ve Protein sentezi G1 kadardır.
M (Mitoz)= Somatik hücre bölünmesi.

Şekil (III) : *HÜCRE SİKLUSU(10,43).*

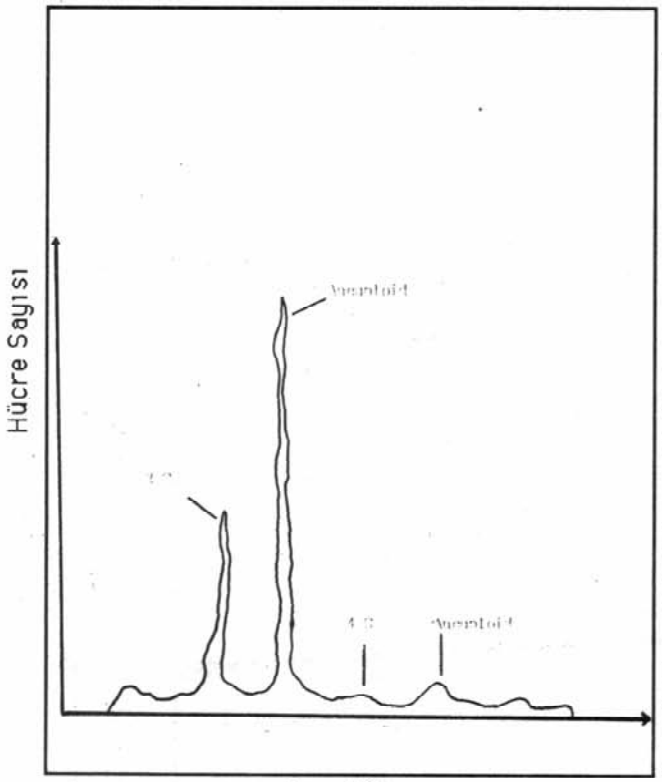
sahip tümörler de vardır (Şekil 6). Bu nedenle DNA verilerinin değerlendirilmesi ve yorumu klinik ve histolojik verileri de inceleyebilecek uzman kişilerce yapılmalıdır (2, 3, 8). DNA içeriğinin yanısıra neoplastik hücrelerde RNA artışı da saptandığından, hücre RNA içeriği analizleri elde edilen bilgileri pekiştirmede ve detaylandırmada kullanılırlar. RNA ölçümü ile özellikle RNA sentezinin gerçekleştiği G1 ve Go fazları birbirinden ayrılırlar (Şekil 3) (2, 8). Ayrıca bazı malignitelerde hücrelerin S veya G2 fazından mitoza atlıyarak Go fazına geçiş göstermesi RNA ölçümleri ile ortaya konur.

DNA ve RNA içerik ölçümlerinin yanısıra, hücre yüzey antijenlerinin, nükleer protein içeriğinin, neoplastik transformasyon ve gelişmede etkili onkojenlerin, onkojenik ürünlerin saptanması da tümörün biyolojik davranışı hakkında bilgi verebilir (2, 6, 8, 9).

ASM çalışmaları sonucu ortaya konan veriler halen standardize değildir ve çeşitli tümör tiplerinin içerdikleri DNA miktarı, bunların tanı ve prognoz açısından yorumlanması laboratuvardan laboratuvara büyük değişiklik gösterebilmektedir (1, 3, 9). Histogramların değerlendirilmesi ve yorumlanması da ilk beklentilerin aksine subjektiftir ve değişik yorumlayıcılar birbiri ile çelişen değerlendirmeler yapabilmektedir, ancak ASM'nin yeni bir sistem olduğu ve daha pek çok çalışmaya ihtiyaç duyduğu gözönüne alındığında ileride bu tür güçlüklerin aşılabileceği düşünülebilir (1, 2, 3, 6, 8).

ASM İLE DEĞERLENDİRİLEBİLEN HÜCRESEL ÖZELLİKLER

ASM yöntemi ile eksojen ajan kullanmadan ölçülebilen özellikler intrensik, eksojen ajan kullanılarak ölçülenler ekstrensik olarak tanımlanır. İki grup halinde incelenen bu yapısal özelliklerin yanısıra, hücrenin bazı fonksiyonel özellikleri de ASM ile saptanabilir (Tablo 4). Bu verilerden hücre boyutları, granülaritesi, nükleik asit içerikleri gibi en sık değer-



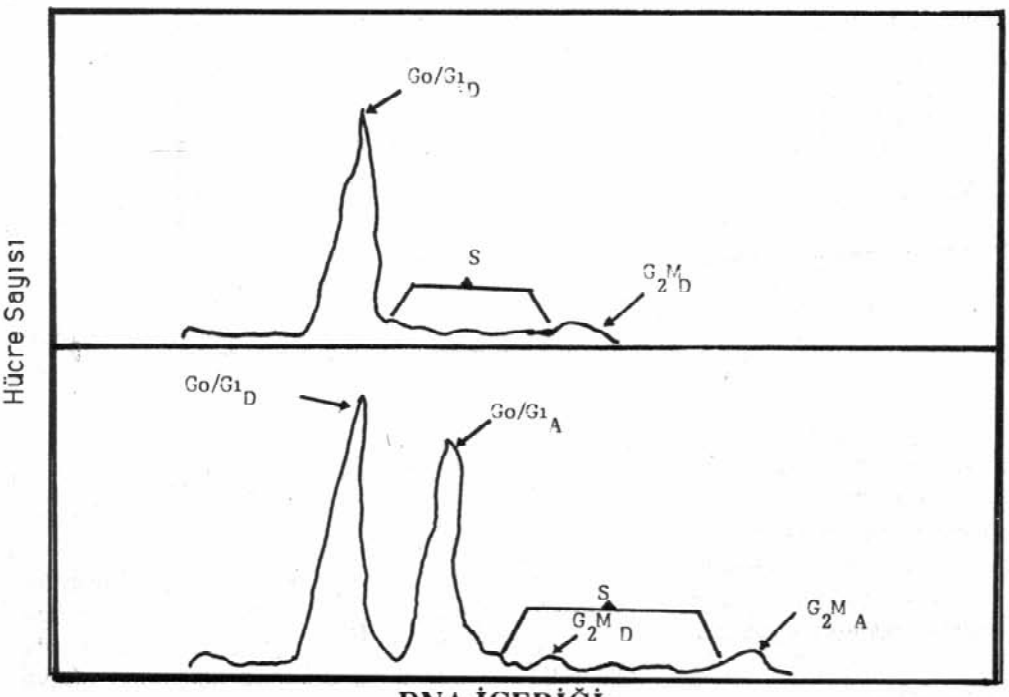
Şekil IV: High-grade pleomorfik liposarkomun DNA histogramı (The use of Flow Cytometry as a Diagnostic Aid in the Management of Soft-Tissue-The Journal of Bone and Joint Surgery Vol: 70-A, June, 1988).

lendirilenleri rutin laboratuvarlarda kullanılabilirken, fonksiyonel parametreler gibi diğer özellikler daha çok büyük laboratuvarlarda ve araştırmaya yönelik çalışmalarda kulanılmaktadır (1, 6).

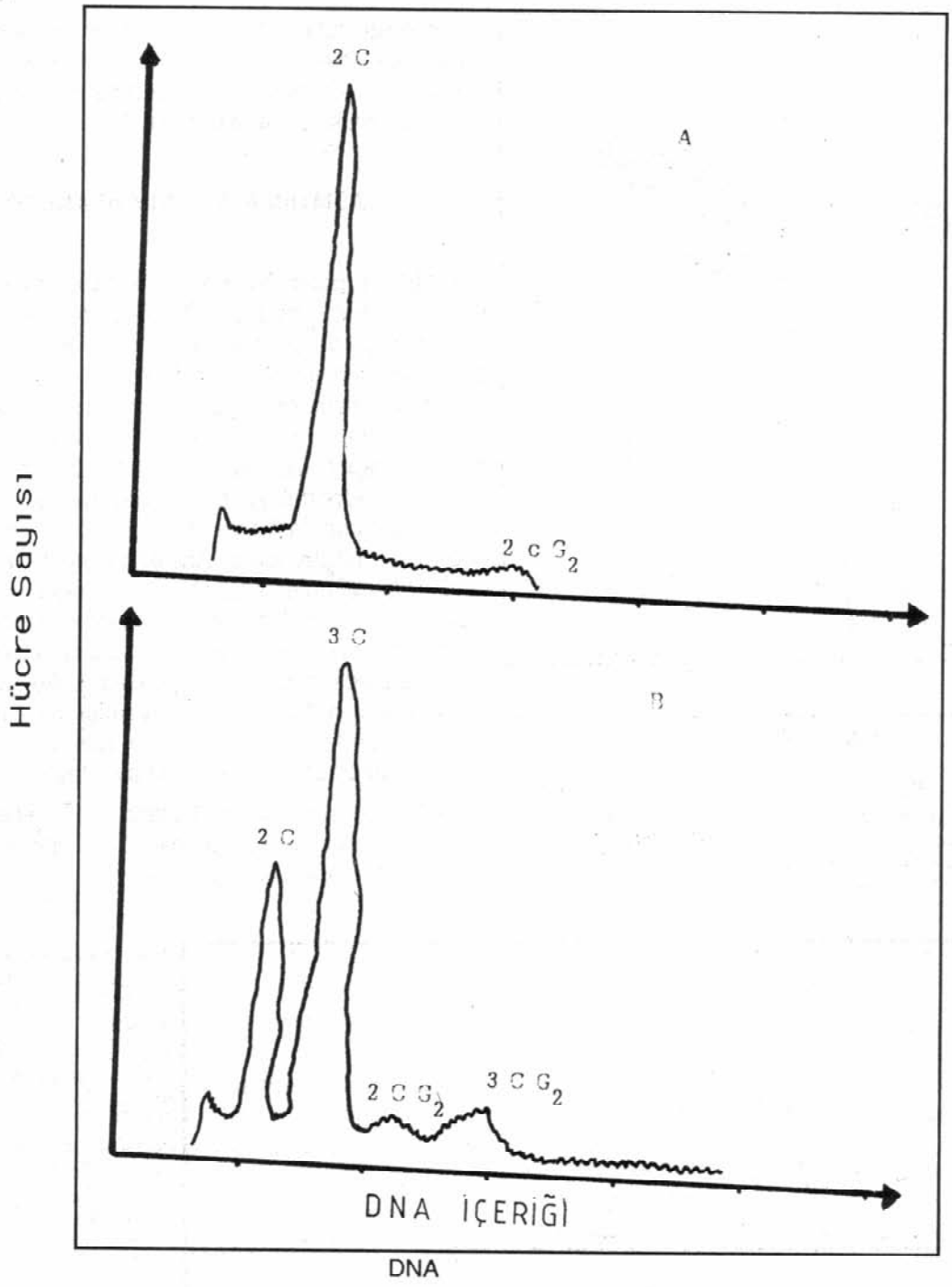
ASM'NİN KULLANIM ALANLARI

ASM'ye tıbbın bir çok alanında kulanım şansı veren iki özellik, heterojen hücre popülasyonları ile çalışabilmesi ve bir çok parametreyi aynı anda değerlendirebilmesidir. Çok değişkenli analizler yapan spektrofotometreler veya spektroflorometreler gibi bir çok sistem homojen hücre süspansiyonlarının analizini yapabilmek için hazırlanmışlardır. Homojen bir hücre popülasyonu ile çalışılıyorsa elde edilen veriler popülasyonun her bir hücresini temsil edebilecek bilgiler içerir. Ancak diagnostik patolojide sıklıkla heterojen hücre popülasyonları ile çalışılmaktadır ve hem tümör hücresi hem nonneoplastik stromal hücreler içeren örneklerin bu tür yöntemlerle değerlendirilmesi zor olmaktadır. Bu yüzden, hem heterojen hücre popülasyonları ile çalışabilmek hem de hücrelere ait 6 farklı parametreyi aynı anda değerlendirmek önemli bir avantajdır.

ASM'nin patolojideki kullanım alanı her gün farklı hastalıkları ve maligniteleri içine alarak genişlemekte, ancak yapılan çalışmalarda birbirinden ol-



Şekil V: A: Diploid (2c) Kolorektal adenomanın DNA histogramı (DAPI boyası).
B: Triploid (3c) Parsial mol hidatiform (DNA aneuploidisine örnek). (Flow Cytometry: Methodology and Applications in Pathology Journal of Pathology, Vol: 149 (1986).



Şekil VI:
Üstte : Tek bir Go/G1 piki içeren Diploid tümör
Altta : İki tane Go/G1 piki içeren ancuploid tümör (Ploidy, Proliferative Activity and Prognosis. Cancer 65, 1990).

dukça farklı sonuçlar alınabildiğinden, verilerin standardize edilmesinde güçlüklerle karşılaşılmaktadır (1, 2, 8, 9). Bu yüzden, kaynaklarda aynı lezyon hakkında birbirine zıt sonuçlar bildiren yayınlara rastlanmaktadır (1, 2, 3).

HEMATOPATOLOJİ

Malign lenfomalar ile lösemilerin klasik morfolojik ve immünohistokimyasal temellere göre sınıflanması, sınıflamanın aynı alt grubundaki hastalarda bile tedaviye cevap ve prognoz açısından ortaya çıkan farklılıkları önleyememektedir.

Tablo (IV): ASM ile Ölçülebilen Hücresel Özellikler

Özellikler	Yapısal	Fonksiyonel
Intrinsik	-Hücre boyutu -Hücre şekli -Stoplazmik granülarite -Pigment içeriği (Hemoglobin, klorofil)	-Redox hali -Canlılık
Ekstrinsik	-Yüzey antijenleri -Lektin bağlama -Total protein -Esas protein -Sulfhidril grupları -DNA içeriği -RNA içeriği -Kromatin yapısı	-Membran devamlılığı -Yüzeyin elektrik yükü -İntraselüler pH -Membran potansiyeli -Sitoplazmikyüzey reseptörü -Enzim aktivitesi -Stoplazmik matriksin yapısı -Membran viskozitesi -Membran permiabilitesi -Endositozis

(Application of Flow Cytometry to Diognastic Pathology, Laboratory Investigation. Vol: 50 No: 2 1984)

ASM ile anöploid klonların ortaya konması, S faz hücrelerinin oranlarının belirlenmesi daha homojen ve prognostik açıdan daha anlamlı yaklaşımlar sağlamıştır. Bununla birlikte, monoklonal yüzey immünglobulinlerini ve diğer lenfosit antijenlerini hedefleyen immünolojik çalışmalar da yapılması ASM tekniğini daha anlamlı kılmaktadır (2, 12, 13). Örneğin, ALL'de immünolojik subgrupların saptanması prognoz tahmininde ve uygun terapötik ajanın seçiminde yararlı olmaktadır.

Hodgkin hastalığında saptanan DNA anöploidisi ve yüksek hücre "turn over"ı yüksek gradelerde görülen bir bulgudur (2, 12).

Derinin T cell lenfomalarında erken tanının, derideki şüpheli infiltratın DNA anöploidisi yönünden ASM ile incelenmesi ile konulabileceği bildirilmektedir (2, 3).

İMMÜNOPATOLOJİ

Periferik kan lenfositlerinin fenotipik analizi ve lenfosit alt gruplarının saptanması, bağışıklık yetersizliklerinde tedavilerin hasta üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve hücresel cevapların daha iyi anlaşılması, primer ve sekonder bağışıklık yetersizliklerindeki immünfenotiplerin belirlenmesi, ASM'nin immünpatolojide kullanım alanlarından bazılarıdır (2, 3, 11, 14).

SİTOPATOLOJİ

Diagnostik sitopatolojide tanı, hücrelerin morfolojisinin deneyimli bir sitopatolog tarafından yorumlanması ile konur ve kullanılan kriterler çoğu kez subjektiftir. ASM'de ise, DNA içerik ve hücre siklus analizleri ile elde edilen bilgiler hem istatiksel olarak hem de matematiksel açıdan daha objektif sayılabilecek sonuçlardır. ASM, sitopatolojide morfolojiye içerik analizleri ile ilgili yardımcı bilgiler sunarak tanıya katkı sağlar.

Eksfoliye hücreleri incelemeye yönelik sitolojik yöntemlerde ASM'nin kullanım alanı yaygındır. Örneğin, mesanenin değişici epitel hücreli karsinomunun tanısında ve bu tanıyı almış hastaların izlenmesinde idrarın ASM ile incelenmesi yararlı olabilmektedir. Burada anlamlı olan bulgu, yüksek grade ile paralel giden anöploidi eğilimidir (8).

Klein ve arkadaşları papiller noninvaziv değişici epitel hücreli karsinomun invaziv olandan daha az DNA anöploidisi gösterdiğini ortaya koymuştur (15).

Servikovajinal örneklerle yapılan çalışmalarda tümör hücreleri örneğin %1 veya daha fazlasını oluşturuyorsa gösterdikleri anormal DNA pikleri ASM histogramları ile saptanabilmektedir (16, 17).

Peritoneal ve plevral effüzyonlarla yapılan çalışmalarda; DNA anöploidisinin reaktif nonepitelyal hücre (lenfosit gibi) içeren effüzyonlarla, daha anlamlı bir korelasyon gösterdiği, adenokarsinomların malign mezotelyomalardan ayrımında CEA pozitifliğinin ve DNA anöploidisinin adenokarsinom tanısını desteklediği belirtilmektedir (18).

ASM, sitopatolojide farklı alanlarda kullanılıyor olmasına rağmen inflamatuvar hücreler, hücre debrisleri, eritrositler, yabancı materyal gibi heterojen grupların bulunuşu değerlendirmeyi güçleştirmektedir. Sitolojik örneklerdeki farklılıkları dikkate alan programların hazırlanması ve örneğin durumuna göre uygulamaya sokulması ASM'nin sitopatolojideki yerini daha sağlamlaştıracaktır.

SOLİD TÜMÖRLER

Lenforetiküler hücrelerden kaynaklanan tümörlerde genellikle yüzey antijenleri kriter olarak kullanılırken, solid tümörlerde hücre DNA içeriği ölçümleri daha anlamlı olmaktadır. Çünkü solid tümörlerin yüzey antijenleri lenfosit diferansiyasyon markerlarına göre daha az sayıda tanımlanmıştır. Ayrıca solid tümörlerde tek hücre süspansiyonu elde etme güçlüğü yüzey markerlarını saptamayı zorlaştırmaktadır.

Son zamanlarda DNA'nın yanısıra şu özellikler de solid tümörlerin tanısına yardımcı olarak kullanılabilmektedir (3): 1. İntrensik hücre özellikleri, 2. RNA içeriği, 3. Sitokeratin tipleri, 4. Onkojen ürünleri bulunup bulunmadığı, 5. Proliferasyon antijenlerinin varlığı, 6. Tümör antijenlerinin varlığı.

Solid tümörlerde ASM ile DNA analizi esas olarak şunları amaçlar (3): A. Morfolojinin yetersiz kaldığı durumlarda malignitelerin tanınması, B. Grade ve stage'den bağımsız prognoz tahmini, C. Borderline neoplazilerde benign-malign ayırımını ortaya koyabilme, D. Tedaviye cevabın izlenmesi.

Aşağıda örnekleri verilen bir çok tümörde ASM ile hücre DNA içerik analizleri yapılmaktadır (Tablo 5).

Mesane Karsinomu: DNA anöploidisinin kötü prognoz işareti olduğu ortaya konmuştur (9). Ancak diploid mesane karsinomlarında ve şiddetli inflamasyonlarda yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir.

İnsitu mesane karsinomlarında yüksek bir yüzde ile saptanan DNA anöploidisi neoplazi tanısını desteklemektedir (19).

Czerniac ve Koss (20) tümör antijenlerinin normal mesane epitelinde ve diploid değişici epitel hücreli karsinomlarda yüksek olduğunu saptamışlardır (20).

Kolon Karsinomu: Bazı araştırıcılar özellikle kolon adenokarsinomlarında ASM'nin potansiyel klinik değeri olduğunu belirtmişlerdir, örneğin Banner ve arkadaşları (21) DNA anöploidisi ile Dukes'un ileri stageleri arasında anlamlı bir korelasyon saptamıştır.

Tablo (V): ASM ile DNA Analizlerinin Sıklıkla Yapıldığı Tümörler

-Akciğer karsinomu	-Mesane karsinomu
-Kolorektal karsinom	-Gastrik karsınom
-Meme karsinomu	-Neuroblastoma
-Prostat karsinomu	-Wilms tümörü
-Uterin karsinom	-Baş ve boyun (Squamos karsinom)
-Melanoma	-Lösemiler
-Renal hücreli karsinom	-Mycloma
-Adrenal karsinom	-Beyin tümörleri
-Tiroid karsinomu	-Sarkomalar
-Testiküler karsinom	

(John S.Conn et al. Biology of Disease Advances in Flow Cytometry for Diognastic Pathology. Laboratory İnvestigation. Vol: 57 No: 5 1987)

Kolon adenokarsinomlarında özellikle villöz adenomlarda ve inflamatuvar hastalıklarda epitel hücrelerinde anöploidi saptanabilmektedir (22, 23). Bunun malignite gelişim riskini gösteren bir bulgu olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (24).

Banner ve arkadaşları (21, 22) kolon kanserlerinde S-faz fraksiyonunun %20'den fazla olmasını kötü prognozla uyumlu bulmuşlardır.

Prostat Karsinomu: Adenokarsinomlarında anöploidinin ileri stagelerde sık görülmesi prognoz hakkında ek bilgiler sağlamaktadır (25, 26).

Malign Melanoma: Özellikle stage-I melanomlarda klinik gidişin gösterdiği değişkenlik nedeniyle yapılan çalışmada DNA anöploidisi saptanan olgularda sık nüks görüldüğü tesbit edilmiştir (27).

Over Karsinomu: Borderline over karsinomlarında DNA anöploidisi kötü gidişle birliktelik göstermektedir (28). İlerlemiş epitelyal over karsinomlarında DNA anöploidisi prognoz tahmininde tek ve en önemli prognostik kriter olarak gösterilmiştir (28, 29).

Meme Karsinomu: DNA ploidisinin primer tümör boyutları, aksiller lenf nodu tutulumu ve hormon reseptörlerinin varlığı ile korelasyonu araştırılmıştır (30,31,32). Amaç hem prognoz tahmini yapabilmek hem de koltuk altı lenf nodu metastazının olup olmadığını ortaya koymaktır. Bazı gruplar lenf nodu metastazının ve primer tümör çapının DNA anöploidisinin derecesi ile ilişkili olduğunu öne sürerken, bazı gruplar böyle bir ilişkinin saptanmadığını bildirmektedir (30,32)

Başka bir çalışma ise anöploidinin az diferansiye tümörler ile birlikteliğini destekler niteliktedir. S-faz fraksiyonunun aksiller lenf nodu tutulumu ve tümörün boyutları ile ilişkisi olduğu gösterilememiştir. Ancak yüksek S-faz fraksiyonu az diferansiye tümörler ile ve östrojen reseptörü negatifliği ile ilişkili bulunmuştur (32).

Akciğer Karsinomu : Volm ve arkadaşları (33) küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları üzerinde yaptığı çalışmada anöploidi saptanan tümörlerde, diploid tümörlere göre yaşam süresi daha kısa, düşük S-faz fraksiyonu saptananlarda yaşam süresi daha uzun bulunmuştur. Yine aynı araştıcıların başka bir çalışmasında küçük hücreli olmayan tümörlerin ileri stage'lerinde anöploidi ile yaşam süresi arasında korelasyon bulunamamıştır (34). Küçük hücreli akciğer karsinomları üzerinde yapılan çalışmalarda ploidi ile prognoz ilişkisi konusunda farklı sonuçlar elde edilmiştir (34, 35).

Tiroidin benign ve malign lezyonları: Hürthle hücreli adenom ve karsinomlarda anöploidi ve ploidinin sınırlı bir tanısal değeri olduğu gösterilmiştir (36,37). Prognoz açısından Hürthle hücreli karsinomlarda anöploidinin kötü prognozla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (36).

Benign tiroid lezyonlarında anöploidi daha az saptanırken, folliküler karsinomlarda %60'a varan DNA anöploidisi saptanmıştır (37).

Yumuşak doku tümörleri: Bu tümörlerde yapılan çalışmalarda halen histolojik yaklaşımlara ek katkı sağlıyacak sonuçlar elde edilememiş olmasına rağmen, gelecekte ASM ile özellikle tümörün grade'i biyolojik davranışı hakkında yararlı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir (38).

Karsinoid Tümör: DNA anöploidisinin karsinoid tümörlerde yaygın olduğu ve biyolojik amin salgılıyan tümörlerde de görülebileceği vurgulanmıştır (39).

Tablo 6 ve 7'de DNA anöploidisinin ve S-faz fraksiyonu yüksekliğinin en sık görüldüğü tümörler sunulmaktadır.

Gestasyonel/Trofoblastik hastalıklar: ASM ile yapılan ölçümler persistan trofoblastik hastalık riskini belirlemede kullanılabilmektedir. Komplet mol hidatidiformda, persistan trofoblastik hastalıklarda diploidi ile beraber normal plasentadakinden daha yüksek hücre "turnover" ı saptanmıştır (40).

ASM ile DNA içeriğini saptayabilme özelliği sayesinde büyük populasyonlardaki kromozom anomalilerini hızlı bir şekilde ortaya koyabilmek ve seks determinasyonlarındaki hataları belirliyebilmek olasıdır (41). DNA ölçümleri biyokimyasal olarak da yapılabilmektedir. Ancak ASM'nin farkı, hücre siklusunun her basamağını ayrı değerlendirebilmesi, kromozom kontraksiyonunun derecesi ne olursa olsun total DNA içeriğini ölçebilmesi ve saniyeler içinde binlerce hücreyi analiz edebilmesidir (41, 42).

SONUÇ

ASM, pahalı bir düzenek gerektirmesi, yetişmiş personele ihtiyaç duyması, yeterince standardize edilmemiş veriler sunması gibi sorunları bulunmasına rağmen, klasik histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlere katkıda bulunabilecek, sayısal ölçümlere dayanan veriler sağlamaktadır.

Tablo (VI): S-Faz fraksiyonundaki artışla kötü prognozun birlikte olduğu solid tömürler

-Meme kanseri : nod negatif (diploid tümörler)
-Küçük hücreli olmayan Akciğer kanserleri (resektabl olanlar)
-Kolon kanseri : Dukes' A,B,C
-Over kanseri : (Yalnız diploid olanlar)

(Douglas E.MERKEL M.D., Willian L.Mc GUİRE M.D. Ploidy, proliferati ve activitiy and prognosis. Cancer 65, 1194-1205, 1990)

Tablo (VII): Aneuploidi ile Kötü Prognozun Birlikte Olduğu Solid Tümörler

-Meme kanseri : Primer nod (-) veya (+)
-Küçük hücreli olmayan Akciğer kanserleri (resektabl olanlar)
-Kolon kanserleri Dukes' A,B,C
-Renal hücreli karsinoma: Tüm stageler
-Mesane kanserleri : Lokalize veya karsinoma insitu
-Prostat kanseri özellikle Stage D1
-Over kanseri tüm Stageler
-Melanoma: Stage I

(Douglas E.MERKEL M.D., Willian L.Mc GUİRE M.D. Ploidy, proliferati ve activitiy and prognosis, Cancer 65, 1194-1205, 1990)

Bu verilerin doğru tanıya katkılarının giderek artması ile, özellikle neoplazik olguların tedavilerinde ve prognozlarının belirlenmesinde bu yönteme gelecekte daha sık başvurulması beklenmektedir.

Teknolojinin bugün ulaştığı noktanın aşılması ile birlikte ASM düzeneğinde olacak gelişmeler bize şu anda tasarı halinde olan bir çok düşüncenin, yakında rutine sokulması imkanını verebilecektir.

KAYNAKLAR

1. O'hara MF, Bedrossian CWM , Johnson TS and Barlogie B. Flow cytometry in cancer diagnosis. Prog. Clin. Pathol 1984; 9: 135-153.
2. Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson JL and McClathey KD. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Laboratory Investigation 1984; 50: 115-140.
3. Coon JS, Landay AL and Weinstein RS. Biology of disease, advances in flow cytometry for diagnostic pathology. Laboratory Investigation 1987; 57: 453-479.
4. Ong SH, Horne D, Young C, Nickolls P, Cole T. Development of imaging flow cytometer. Analytical and Quantitative Cytology and Histology 1987; 9: 375-382.
5. Auer G, Askensten U and Ahrens O. Cytophotometry. Hum. Pathol 1989; 20: 518-527.
6. Quirke P and Dyson JED. Flow cytometry: Methodology and applications in pathology. J. Pathol 1986; 149: 79-87.
7. Coon JS. Landay AL and Weinstein RS. Flow cytometric analysis of paraffin-embedded tumors: implications for dignostic pathology. Hum. Pathol 1986; 17: 435-437.

8. Shapiro HM. Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity Arch. Pathol. Lab. Med. 1989; 113: 591-597.
9. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. Cancer 1990; 65: 1194-1205.
10. Cormack Wid H. Ham's Histology, 9th edition 1987 J.B. Lippincott Company, Philadelphia p: 45-46.
11. Nickolson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immuciency diseases. Arch. Pathol. Lab. Med. 1989; 113: 598-605.
12. Diamond LW, Nathwani BN and Rappaport H. Flow cytometry in the diagnosis and classification of malignant lymphoma and leukemia. Cancer 1982; 50: 1112-1135.
13. McIntire TL, Goldey SH, Benson NA and Braylan RC. Flow cytometric analysis of DNA in cells obtained from deparaffinized formalin-fixed lymphoid tissues. Cytometry 1987; 8: 474-478.
14. Patrick CW, Ash R, Libnock JA, Keller RH. Clinical cytometry and immunophenotyping. Pathol. Immunopathol. Res. 1987; 6: 64-76.
15. Klein Fa, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF, Melamed MR. Detection and follow-up of carcinoma of the urinary bladder by flow cytometry. Cancer 1982; 50: 389-395.
16. Fowlkes BJ, Herman CL, Carsidy M. Automated analysis of normal and abnormal gynecologic specimens using flow analysis of morphologic descriptions. Acta. Cytol. 1975; 19: 588.
17. Fowlkes BJ, Herman CJ, Carsidy M. Flowmicrofluorometric system for screening gynecologic cytology specimens using propidium iodine-fluoroscein isothiocyanate. J. Histochem. 1976; 24: 322-331.
18. Croonen AM, Van Der Valk P, Herman CJ and Lindeman J. Cytology, immunopathology and flow cytometry in the diagnosis of pleural and peritoneal effusions. Laboratory Investigation 1988; 58: 725-732.
19. Melamed MR, Klein FA. Flow cytometry of urinary bladder irrigation specimens. Hum. Pathol 1984; 15: 302-305.
20. Czerniak B, Koss CG. Experrision of Ca antigen on human urinary bladder tumors. Cancer 1985; 55: 2380-2383.
21. Banner BF, Chacko MS, Roseman DL, Coon JS. Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma? Ann. Surg. 1985; 202: 740-744.
22. Banner BF, Chacko MS, Roseman DL, Coon JS. Multiparameter flowcytometric analysis of colon polyps. Am. J. Clin. Pathol. 1987; 87: 313-318.
23. Fozard JB, Quirke P, Dixon MF, Giles GR, Bird CC. DNA aneuplody in ulcerative colitis. Gut 1986; 27: 1414-1418.
24. Hammanberg C, Slerak P, Tribulcait B. Early detection of malignancy in ulcerative colitis. Cancer 1984; 53: 291-295.
25. Fordam MVP, Burdge AH, Mattheus J, Williams G, Cooke T. Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical out come. Br. J. Surg 1986; 73: 400-403.
26. Frankfurt OS, Arbuck S, Chin JL, Greco WR, Pavelic ZP, Stocum HK. Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors. Ann. NY Acad. Sci 1986; 468: 276-290.
27. Conn JS, Bines S, Kleir S, Soong S. DNA flow cytometry in stage I cutaneous melanoma. Cytometry (Suppl) 1987; 1: 55.
28. Friedlander ML, Russell P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN. Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to diagnosis of ovarian tumours of borderline malignancy, Pathology 1984; 16: 301-305.
29. Rudenburg JC, Cornelisse CJ, Heintz PA, Hermens J, Flowen GJ. Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. Cancer 1987; 59: 317-323.
30. Hedley DW, Rugg CA, Ng AB, Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients. Cancer Res. 1984; 44: 5395-5398.
31. Thorud E, Fossa SD, Vooge S, Koolhaus O, Kunesan O, Skolaib MC. Primary breast cancer Flowcytometric DNA paterns in relation to clinical histopathologic charcteristics. Cancer 1986; 57: 808-811.
32. Mc Divitt RW, Stone KR, Craig RB, Palmer JO, Meyer JS, Baver WC. A proposed classification of breast cancer based on kinetic information. Cancer 1986; 57: 269-276.
33. Volm M, Mattern J, Sonka J, Vogt-Schaden M, Wayss K. DNA distribution in non-small-cell lung carcinomas and its relationship to clinical behavior. Cytometry 1985; 6: 348-356.

34. Volm M, Drings P, Mattern J, Sonka J, Vogtmaykopf I, Wayss K. Relevance of DNA-fluorimetry and short term resistance testing for adjuvant treatment of non-small cell lung carcinoma. Anticancer Res. 1986; 6: 931-934.

35. Moran RE, Melamed MR. Flow cytometric analysis of human lung cancer; correlation with histologic type and stage. Analyt. Quant. Cytol. 1984; 6: 99-104.

36. Bronner MP, Clevenger CV, Edmonds PR, Lowell DM, McFovland MM and Livolsi VA. Flow cytometric analysis of DNA content in Hurthle cell adenomas and carcinomas of the thyroid. Am. J. Clin. Pathol 1988; 89: 764-769.

37. Hostetter AL, Hrafnkelsson J, Wihgren SOW, Enestrom S, Nordenskjold B. A comperative study of DNA cytometry methods for benign and malignant thyroid tissue. Am. J. Clin. Pathol. 1988; 760-763.

38. Matsuno T, Gebhardt MC, Schiller AL, Rosenberg AE, Mankin HJ. The use of flow cytometry as a diagnostic aid in the management of soft tissue tumors. J. Bone and Joint Surg. 1988; 70: 751-759.

39. Kujavi H, Joensuu H, Klemi P, Asola R, Nordman E. A flow cytometric analysis of 23 carcinoid tumors. Cancer 1988; 61: 2517-2520.

40. Hemming JD, Quirke P. Identification of persistent tropohoblastic disease. J. Pathol. 1986; 148: 100-101.

41. Kent M, Chandler R, Wachtel S. DNA analysis by flow cytometry. Cytogenet. Cell Genet. 1988; 47: 88-89.

42. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic basis of disease. 4th ed. 1989 Saunders, Philadelphia: Saunders, 1989; p: 127-128.