

Tümör Prognozunda hücre proliferasyonun morfolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi *

Dr. Figen Söylemezoğlu **, Dr. Ayşe Ayhan ***,

ÖZET

Histopatologlar, tümörün proliferasyon hızını yansıtan ya da yansıttığı düşünülen değişkenleri saptamak ve bu değişkenlerin metastaz potansiyeli, rekürrens ve mortalite ile olan ilişkisini değerlendirmek yönünde zaman ve emek harcarlar. Bu kısa derlemede, günümüzde mevcut çeşitli teknikleri gözden geçirilecek ve bunların günlük patoloji kullanımındaki yeri değerlendirilecektir.

Anahtar Kelimeler : Hücre proliferasyonu, prognostik faktörler, immünohistokimya, proliferasyon işaretleyicileri, mitotik indeks.

GİRİŞ

Patolojide tümörün büyüme hızının, biyolojik davranışı konusunda belirleyici olduğuna dair genel bir inanç vardır. Bu nedenle de tümör proliferasyonunu yansıttığı düşünülen çeşitli değişkenlerin değerlendirilmesi yönünde çaba harcanmaktadır. Bu değişkenlerin metastaz hızı, tümör rekürrensi ve mortalite ile korelasyonu pek çok çalışmanın ana fikrini oluşturmuştur. Bu parametrelerin değerlendirilmesinde bazı temel sorunlar vardır.

1. Bunlar gerçekten tümör hücre proliferasyonunu veya tümör büyümesini yansıtmakta mıdır?
2. Bu değişkenler gözlemler, laboratuvarlar arasında farklılık gösterir mi? Bir diğer değişle tekrarlanabilirlikleri nedir?
3. Diğer prediktif prognostik özellikleri ile karşılaştırıldıklarında anlamlı mıdır?

Bir prognostik faktörün yukarıda sıralanan ön koşulları karşılaması gerekmektedir. (Tablo - 1) Ayrıca patolojide prognostik faktörlerin belirlenmesi konusunda kalite kontrol mekanizmalarının harekete geçirilmesi gerekmektedir.^{1,2}

Tablo 1 : Prognostik faktörün taşıması gereken kriterler

Anlamlı bağımsız bir prediktif değer olmalı
Yöntem tekrarlanabilir olmalı
Diğer prediktif faktörlerle korelasyon göstermeli

Tümör hücresi büyüme kinetiği

Normal doku ile koordine olmayan aşırı büyüme, neoplazinin temel özelliklerinden biridir. Transforme olan her hücrenin bölün-

SUMMARY

Histopathologists spend time and effort in attempting to measure variables that reflect or seem to reflect the tumour proliferative rate, and in correlating these variables with metastatic potential, tumour recurrence, and overall mortality. In this short review we survey the several currently available techniques, and assess which are worth recommending for routine pathology practice.

Key words : Cell proliferation, prognostic factors, immunohistochemistry proliferation markers, mitotic index

me yeteneğini sürdürdüğünü ve yaşamaya devam ettiği varsayılırsa, tek bir transforme hücrenin klinik olarak tesbit edilebilen büyüklükte bir kitle oluşturabilmesi için 30 bölünme siklusu geçirmesi gerekir. Söz konusu kitle, yaklaşık 10 mikron çapta, 1 gm ağırlığında ve 10^9 hücreden oluşan bir kitledir. Bir kilogram ağırlıkta bir tümör kitlesi (yaklaşık 10^{12} hücre) büyüklüğüne ulaşabilmek için ise, ek olarak sadece 10 bölünme siklusu daha geçmesi gerekir. Burada tahminlerimizi yaparken yukarıda varsaydığımız gibi tümörün bir "patolojik dinamo" olmadığını biliyoruz. Gene de bu tahmin solid bir tümörün, klinik olarak saptanabilir. Büyüklüğe ulaştığında hayat siklusunun büyük bir kısmını tamamlamış bulunduğunu göstermesi açısından önemlidir.

Tümör hücre siklusu

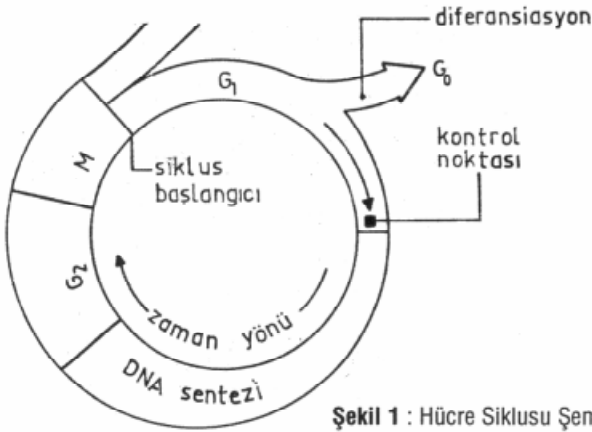
Her hücre popülasyonu, hücre siklusu açısından birtakım subgruplardan oluşmaktadır. I/Mitoz(M) fazında, devamlı çoğalan, bir mitozdan diğerine ilerleyen hücreler, II/Terminal olarak diferansiye olmuş ve bir daha bölünmeyecek şekilde programlı ölümlerine kadar büyüme siklusunu terketmiş hücreler, III/ Prolifere olmayan, proliferatif havuzdan çıkmış ancak istirahat fazında (G_0) olan ve uygun stimulus varlığında yeniden proliferatif havuza dönebilecek kapasiteye sahip hücreler.

Tümör hücrelerinin siklusu da, nontümöral hücrelerdeki gibi G_0 , G_1 , S, G_2 ve M fazlarından oluşmaktadır (Şekil 1). Genelde tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha hızlı bölündüğü öngörüsü yanlıştır. Yapılan çalışmalar, pek çok tümörde total hücre siklusunun, normal hücrelerle aynı veya onlara nazaran daha

* XI. Ulusal Patoloji Kongresinde panel konuşması olarak sunulmuştur.

** HÜTF Patoloji Anabilim Dalı, Öğretim Görevlisi

*** HÜTF Patoloji Anabilim Dalı, Profesör



Şekil 1 : Hücre Siklusu Şeması

uzun olduğunu göstermiştir. Kısaca, tümör büyümesinin hücre siklusunda kısalma ile beraber gitmediği sonucuna varılabilir.

Büyüme fraksiyonu: Tümör popülasyonunda bulunan hücrelerden proliferatif havuza dahil olanlar tümörün büyüme fraksiyonunu belirler. Tümörlerin erken evrelerinde tümör hücrelerinin büyük bir çoğunluğu proliferatif havuzda iken daha büyük

Metod	Özel doku/takip gereksinimi	Siklus spesifitesi
Mitotik sayım	yok	mitoz
Timidin işaretlenme indeksi	taze doku	S
BrdU işaretleme indeksi	in vivo/taze	S
AgNOR	yok	?
İmmünohistokimyasal işaretleyiciler		
PCNA	yok	G1,S,G2
Ki-67	frozen	G1,S,G2,M
MIB 1-3	mikrodalga	G1,S,G2,M
DNA polimeraz α	frozen	G1,S,G2,M

Tablo II :Tümör Proliferasyon Fraksiyonunun Ölçümü.

çapa ulaşan tümörlerde büyüme fraksiyonu azalır. Tümör büyüdükçe büyüme fraksiyonunun azalmasının nedenleri, tümör hücrelerinin beslenme yetersizliğine bağlı olarak veya diferansiasyon sonucu istirahat fazına dönmeleri ve replikasyon havuzundan çıkmaları ya da yaşamla bağdaşmayan mutasyonlar içermeleri sonucu ölümleiridir. Diğer bir deyimle tümörün büyüme hızını, hücre proliferasyonu ve hücre kaybı arasındaki denge belirler. Küçük hücreli akciğer karsinomları, lösemi ve lenfoma gibi tümörlerde büyüme fraksiyonu yüksek, diğer solid tümörlerde ise düşüktür.

Total tümör kitlesi, hücre kaybı ile canlı hücrelerin proliferatif potansiyeli arasındaki dengeye bağlıdır ve hücre döngüsünün yavaş olduğu tümör gruplarında hücre kinetiği çalışmaları anlamlı bir prediktif değer olabilmektedir. Bu amaçla kullanılan mevcut yöntemler şöyle özetlenebilir (Tablo II).

Mitoz Sayısı

On büyük büyütme alanında (BBA) yapılan mitoz sayımı yıllarca histopatologlar tarafından tümör patolojisinde tanılal ve prognostik bir belirleyici olarak kabul edildi. Oysa bugün mitoz sayımının tümörün proliferatif aktivitesinin bir göstergesi olma-

sı fikri tartışmalıdır.^{1,2} Büyük büyütme alanlarındaki rakamsal farklılıklar, tespit gecikmeleri, gözlemci deneyimi, kesit kalınlıkları v.b. nedenlerle standardizasyon ve tekrarlanabilirliği konuları bu yöntemle karşı geliştirilen eleştirilerin başında gelmektedir. Örneğin 1BBA mikroskoplar arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Aynı tümörün farklı mikroskoplarda yapılan sayımlarında 3 ile 20 mitoz/10 BBA gibi farklılıklar saptanmıştır.³ Bu nedenle bazı araştırmacılar BBA'na düşen mitoz yerine mm^2 'ye düşen mitoz sayısının, mitoz değeri olarak bildirilmesinin standardizasyonu sağlayacağı görüşünü öne sürmüşlerdir. Bir diğer grup ise tümör hücre sayısı ile mitoz sayısının oranlanarak mitotik indeks elde edilmesinin daha uygun olacağını öne sürmüşlerdir.

Tümör hücre çapları ile mitoz sayısı ve tümörün biyolojik davranışı arasında bir ilişki olmaması nedeniyle mitotik indeks, mm^2 biriminde yapılacak sayımlardan çok daha anlamlı ve sağlıklı sonuçlar vermektedir.^{1,4}

Timidin işaretleme indeksi (TLI)

Bu metotla radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA prekürsörü kullanılır ve bu prekürsörün proliferatif hücreye entegrasyonu saptanır. TLI hücre siklusunun S fazındaki hücre yüzdesinin bir ölçüsüdür. Taze dokunun uygun ortamlarda (hiperbarik vs) 3H-Tdr (trited thymidine) ile 1-2 saat inkübe edilmesi, rutin takibi doku kesitlerinin bir haftalık exposure ile otoradyografi ile çıkarılması esasına dayanan bu metod ile total tümör hücre sayısının işaretli hücre sayısına oranı elde edilir ve TLI yüzde (%) olarak ifade edilir. Taze doku kullanımı, radyoaktivite ile çalışma, örnekleme hataları, gözlemcinin pozitif hücre yorumundaki ön yargısı gibi kısıtlayıcı faktörler mevcuttur. Ayrıca TLI sadece S fazındaki hücre sayısının bir ölçütüdür. S fazı süresini ölçmez. Yani düşük hücre proliferasyon hızı olan bir tümörün TLI değeri yüksek olabilir. Ölçümleri için taze doku gerekliliği, zaman alıcı olması, otoradyografi gerekliliği nedeniyle TLI rutin patoloji laboratuvar kullanımına girmemiş bir tekniktir.^{1,2,5,6}

Bromodezoksüridin (BrdU) işaretleme indeksi

Timidin analogu olan 5-BrdU'de S fazı işaretlenme indeksini vermektedir. Teknik olarak TLI metodu ile benzerlikler göstermekle birlikte 1982'den sonra 5-BrdU'ne spesifik moAb'lar geliştirilmesi ile immünohistokimyasal (IHK), immüno floresan veya flow sitometri yöntemleri ile S fazında BrdU ile ilişkiye girmiş hücreler saptanabilir. BrdU in vivo verilir ve dokular 4-5 saat sonra incelemeye hazır hale gelir. TLI'e göre daha kullanışlı bir metod olmakla birlikte örnekleme ve gözlemci faktörleri bu metod için de geçerlidir. BrdU'nin in vivo verilmesi gerekliliği uygulamada güçlüğü yaratarak özellikle retrospektif çalışmayı olanaksız kılmaması nedeniyle kullanım kısıtlılığı yaratır.^{1,2,7}

AgNOR

NOR (nükleer organizasyon bölgeleri) rRNA'yı kodlayan DNA parçalarıdır ve insanda 13,14,15,21 ve 22 kromozomların kısa kollarında yer alırlar. Her akrosentrik kromozom bir çift NOR içerir. Sonuçta bir diploid hücre 20 NOR'a sahiptir. NOR'lar RNA polimeraz I, C23, B23, gibi bazı proteinler ile ilişki içindedir. AgNOR tekniği denilen bir gümüş impregnasyon metodu ile

sözü edilen NOR-asosiye proteinler gösterilebilir. Ortalama Ag-NOR sayımı 50-100 hücrede gerçekleştirilir.⁹

AgNOR sayımı ile gerçekte neyin ölçüldüğü tam olarak bilinmemektedir. AgNOR sayımının gerçek bir sayım olmadığı, NOR-asosiye proteinlerin hücre içindeki saçılmışlığının ölçütü olduğu ileri sürülmektedir. AgNOR sayımının rRNA ve protein sentezinin bir göstergesi olması nedeniyle proliferasyon hızı ile korelasyon gösterdiği öne sürülmekle birlikte pek çok tümörde benign-malign ayırımında anlamlı olabiriken, borderline lezyonlarda (gri zonda) yararlı olmamaktadır.^{1,8,9,10}

Eğer AgNOR'lar hücre proliferasyonu ile ilişkili kabul edilirse, diğer proliferatif indekslere özgü sorunlar bu metod için de geçerlidir.^{1,9,10}

İmmünohistokimyasal işaretleyiciler

Monoklonal antikorların (moAb) kullanımı ile yapılan immünohistokimyasal proliferasyon çalışmaları, proliferasyon ile ilişkili proteinlerin statik olarak saptanmasıdır, yani gerçek proliferasyon hızı değildir.^{1,2} Bu grup içinde Ki-67, MIB 1-3, PCNA ve DNA polimeraz α gözden geçirilecektir.

PCNA (proliferating cell nuclear antibody): 36 kD'luk nonhiston nükleer bir protein olan PCNA/cyclin, DNA polimeraz delta için bir kofaktördür. Bu faktör hücre siklusunun geç G1 fazında izlenir, G1/S interfazında pik yapar. M fazında ve istirahatteki hücrelerde immünohistokimyasal olarak ekspres olmaz. Formalin fikse parafine gömülü doku kesitlerinde çalışan çok sayıda ticari PCNA moAb'ları mevcuttur. Farklı PCNA Ab'ları farklı PCNA epitoplarını tanırlar ve buna bağlı olarak hücre siklusundaki dağılımları farklılık gösterir. Bu nedenle farklı PCNA Ab'ları karşılaştırılırken dikkatli olmak gereklidir. PCNA, Ki-67 ile karşılaştırıldığında S faz spesifik olarak dikkati çeker. Bazı tümörlerde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda yüksek grade'li gliomlarda PCNA'nın Ki-67'ye oranla daha spesifik S faz belirleyicisi olduğu ancak daha az sensitif bir proliferasyon işaretleyicisi olduğu saptanmıştır.^{2,11,12}

Ki-67, MIB 1-3 : Gerek Ki-67 gerekse MIB 1-3 Gerdes tarafından üretilmiştir. Bu antikorların tanıdığı nükleer antijen proliferasyon olan hücrelerde bulunur. Ki-67, 395 ve 345 kD'luk hücre siklusunun tümünde mevcut olan nonhiston tipte nükleer bir proteindir. Bu proteinin nükleer matriksin bir komponenti olduğu ve hücre siklusunun G1, S, G2, M süresince ekspres olduğu bilinmektedir. Ki-67 boyanma indeksinin direkt tanısallığı ve bağımsız prognostik bir faktör olduğu pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır.^{13,14}

Ki-67 antijeninin (Ag) rekombinan kısımlarını immünojen olarak kullanarak Gerdes ve ark.ları MIB 1-3 isimli yeni bir monoklonal antikorlar (Ab) üretmişlerdir. Bu ab'lar parafin kesitlerde ancak yeni antijen açığa çıkartma metodları ile çalışabilmektedir.^{15,16} Örn. pH 6.0 sitrat bufferda, mikrodalga fırında 5 dakika 700 W ile ısıtma işlemine tabii tutulan formalin fikse, parafine gömülü dokularda MIB 1-3, Ki-67 Ag'nin tanıdığı tüm epitoplarla ilişkiye girebilmektedir.¹⁷ Böylece arşiv

A. Biyolojik parametreler

Doku/tümör tipi
Hücre siklus süresi
Intratümöral heterojenite

B. Teknik parametreler

Fiksasyon tipi ve süresi
Araştırılan Ag-Ab epitopu
Doku takibi
Enhancement işlemleri
IHK metodunun sensitivitesi

C. Yorum

Örneklemede ön yargı
Değerlendirme ve skorlama metodu
Hata marjı

Tablo 3 : Kalite Kontrol Parametreleri

materyalleri üzerinde çalışma mümkün olabilmektedir. MIB 1-3, Ki-67 tümör büyüme fraksiyonunun bir ölçütüdür. Ki-67 boyanması ile TLI ve BrdU işaretlenme indeksi genellikle korelasyon gösterirler. Ki-67 boyanması flow sitometrik S faz fraksiyonu değerleri ile de korelasyon göstermektedir.²

DNA polimeraz α : DNA sentezindeki anahtar enzimlerden biridir ve G1, S, G2, M fazlarında sentez edilir. Go fazında mevcut değildir. Bu enzime karşı geliştirilmiş moAb'lar ticari olarak mevcuttur. Frozen doku kesitlerinde çalışır. DNA polimeraz α 'nın klinik değeri henüz geniş seri çalışmaları ile kanıtlanmamıştır.^{2,18,19}

Kalite kontrol parametreleri

Yukarda söz edilen moAb'ların patolojide hücre proliferasyon belirleyicisi olarak yaygın kullanıma girmesi ile gerek boyanma, gerek yorumlama aşamasında kalite kontrolü gündeme gelmektedir (Tablo-III).

- Tümörün tipi, intratümöral heterojenite, hücre siklus uzunluğu gibi biyolojik faktörler hücre proliferasyonu çalışmalarını etkileyen parametrelerdir. Bunlar değiştirilmesi ve denetlenmesi en zor, hatta olanaksız olan parametrelerdir.

- Fiksasyonun tipi ve süresi antijenik epitopun korunmasında en önemli faktörlerdendir. 6-24 saati aşmayan, tamponlanmış nötral %4 formaldehit fiksasyonu ile ideal immünreaksiyon elde edilebilir. 48 ve 72 saati aşan fiksasyon reaksiyon kalitesini azaltır. Ayrıca kullanılan İHK yöntemlerinin sensitiviteside farklılık gösterebilir. Çeşitli antijen açığa çıkartma yöntemleri, bazı moAb'ların boyanma kalitesini yükseltmek için kullanılabilmektedir.¹⁷ Teknik parametreler denetlenmesi daha kolay ve mümkün olan faktörlerdir.

- En önemli parametre yorumdur. Hücre sayımı işlemi BBA başına mı yoksa hacim üzerinden mi yapılmalıdır? Bütün pozitif

hücreler mi sayılmalıdır? Zayıf pozitif hücreler nasıl yorumlanmalıdır? Sayımlar tekrarlanabilir mi? Vizüel sayımlar yeterli midir? Yoksa görüntü analizi gerekli midir? Bütün bu sorular yanıtı kalabileceği gibi her laboratuvar farklı yanıtlar verebilir. Çünkü bu konuda uluslararası kabul edilmiş, standart bir metod yoktur.

Çoğu araştırmacı yüksek işaretlenme yoğunluğu gösteren random alan seçmekte ve yaklaşık 1000 tümör hücresi sayıp pozitif fraksiyonu % olarak bildirmektedir. Sayılan hücre sayısının artırılması hata oranını düşürmektedir. Boyanma yoğunluğu da hesaba katılmalı mı sorusu henüz net olarak cevaplanmamıştır^{1,2}

KAYNAKLAR

1. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990; 160: 93-102.
2. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97 (Suppl1): 4-13.
3. Ellis PSJ, Whitehead R. Mitosis counting-A need for reappraisal. *Hum Pathol* 1981; 12:3-4.
4. Woosley JT. Measuring cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 555-557.
5. Meyer JS. Growth and cell kinetic measurement of human tumors. *Pathology Ann* 1981; 16:53-81.
6. Meyer JS. Cell kinetic measurements of human tumors. *Hum Pathol* 1982; 13: 874-877.
7. Elwart J, Dörner P. Effect of 5-fluoro-2-deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with a monoclonal BrdUrd/Hoechst quenching effect. *Cytometry* 1985; 6: 513-520.
8. Ploton D, Menager M, Jeanneson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18:5-14.
9. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organiser regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988; 155: 95-96.
10. Crocker J, Boldly AR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
11. Hall PA, Levison DA, Woods AL. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
12. Coltrera MD, Gown AM. PCNA/Cyclin expression and BrdU Uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 23-30.
13. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
14. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 1710-1715.
15. Gerdes J, Becker MHG, Key G, Cattoreti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 Ontigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.* 1992; 168 : 85-87.
16. Cattoreti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed, paraffin sections. *JPathol* 1992; 168: 357-363.
17. Shi RR- Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.
18. Bensch KG, Tanaka S, Hu S. Intracellular localization of human DNA polymerase α with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1982; 257: 8391-8396.
19. Tanaka S, Shi-Zhen H, Shu-Fong Wang T. Preparation and preliminary characterization of monoclonal antibodies against human DNA polymerase. *J Biol Chem* 1982; 257: 8386-8390.