

## DERLEME

### FLOW SİTOMETRİ (Flow Cytometry)

Dr. Şenol ERGÜNEY\*, Dr. Ali ACAR\*, Dr. Esat M. ARSLAN\*,  
Dr. Şükrü ÇELİK\*, Dr. Ercüment ACARER\*

\*S.Ü.T.F. Üroloji Anabilim Dalı

1930'lu yıllardan beri ürotelyal kanserlerde gerek voiding gerekse mesane yıkaması veya pelvis renalisin irrigasyonu, fırça biyopsisi şeklinde alınan numuneler kullanılarak özel boyama teknikleriyle hücreler incelenmekte (üriner sitoloji), hatta bu teknikler yüzey kan grubu antijenleri, hücre enzimleri, bazı markerler ve kromozomal komponentler gibi değişik yöntemlerle kombine edilerek erken teşhis ve tedavi sonrası izleme amacıyla kullanılmaktadır (1). Ancak konvansiyonel sitolojinin zaman alması ve düşük grade ve stage'li tümörlerde false negatif sonuç vermesi, kantitatif bir netice vermemesi, subjektif olması gibi bazı dezavantajları vardır (1, 2, 3).

Son yıllarda süratle gelişen flow sitometri, konvansiyonel sitolojinin yerini almak için ortaya atılmıştır. Tamamen komputere edilmiş olup elektronik sisteme göre çalışan cihazda lazer ışını ve floresans boya metodu da devreye sokulmuştur.

Cihazın çalışma sistemi kısaca şu şekilde özetlenebilir: Hazırlanan hücre süspansiyonu cihazın örnek bölmesine konur. Buraya hidro dinamik olarak odaklama yapılır. Hücreler çok dar bir quartz kanaldan geçirilir (250 mikrometre). Bu esnada lazer kaynağı kullanan bir ışık sistemiyle hücreler tek tek incelenir (argon lazeri, 480 nm) İşlemden önce hücreler metakromatik akrinin orange boyası ile boyanır. Bu boya lazer ışınıyla karşılaşınca DNA ve RNA muhtevasına göre farklı renklerde floresans verir. Hücreler tarafından çeşitli açılarda saptırılan ışınlar dedektörler tarafından incelenir, kaydedilir, elektronik işaretlere çevrilir, sayısal hale getirilip depolanır ve kompiuter tarafından analiz edilerek bir histogram çizilir.

Bu teknikle bir dakikadan daha az bir sürede

5000-10000 hücre analiz edilebilir. Flow sitometri ile değerlendirilebilen başlıca hücre kriterleri şunlardır:

"Hücre hacmi, sitoplazmik granülarite, hücre yaşayabilirliği, hücre siklus zamanı, DNA muhtevası, yüzey belirleyici fenotipi ve enzim muhtevası" (1)

Flow sitometri birçok yerlerde lösemi ve lenfomaların analizlerinde rutin hale gelmiştir (1). Sıvıların yanısıra formaline fikse edilip parafine gömülmüş dokularda bile taze dokularda alınan sonuçlara aşağı yukarı eşdeğer sonuçlar alınmıştır (1, 2, 3, 4). Günümüzdeki solid tümörlerde kullanım endikasyonları şunlardır:

- 1- Morfolojik değişiklikler belirgin olmayınca malignite teşhisini desteklemek,
- 2- Sınırdaki maligniteleri subklasifiye etmek,
- 3- Stage ve grade'den bağımsız olarak prognoz ile ilgili bilgi vermek,
- 4- Tedaviye olan cevabı izlemek,
- 5- Tümörlerde relaps gelişim nedenini anlamak,
- 6- Tümörlerin orjinini araştırmak.

DNA anormallikleri açıklanırken bahsi geçecek olan ploidi kriterleri, euploidi, tetraploidi vb. gibi bazı terimler hakkında kısaca bilgi vermek faydalı olacaktır (5).

Bilindiği gibi eşey hücrelerinde 23 adet kromozom bulunur ve bu sayı insan için haploid (=n) sayıdır. İnsanın somatik hücrelerindeki kromozom sayısı ise eşey hücrelerindeki sayının iki katıdır, yani diploiddir (2n= 46). Kromozom sayısındaki artış ve azalışlar

temel kromozom sayısının (n= 23) tam katları kadar oluyorsa buna euploidy, ve sayıya da euploid denir. Kromozom sayısındaki temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmeler aneuploid adını alır ve vakaya da aneuploidy denir (5). Poliploidy de bir euploid durumdur ve temel sayının ikiden daha çok artması durumunda (3n, 4n, 5n) kullanılır. Yani iki tür sayısal düzensizlik sözkonusudur. 1- Euploidy 2- Aneuploidy

Normal hücreler diploid kromozom yapısı gösterirler. Enflamasyona maruz kalmış hücreler hiperdiploid görünüm verirler. Bu da sonuçta false pozitiflik verebilir. Bunun yanısıra düşük grade ve stage'li tümörler hala diploid olabilirler (false negatif sonuç). Bu hastaların prognozu da iyi olmaktadır. Triploid veya tetraploid tümörler genellikle ileri derecede grade'e sahiptirler. Bunların prognozu da kötü olur. Yüksek gradeli aneuploid tümörü olan ve S fazında % 10'dan fazla hücresi olan tümörlerde lenf nodu metastazında artış görülür. Aneuploid popülasyon birden fazlaysa bu tümörlerin progresyonu da daha hızlıdır. Radyoterapi gören hastalarda hala triploid veya tetraploid hücre toplulukları sebat ediyorsa prognoz kötü olacaktır. Enteresan olan bir nokta ise radyoterapinin diploid tümörlerden ziyade triploid veya tetraploid tümörlerde daha etkili olmasıdır (1, 2, 3, 4, 5).

### Mesane Tümörlerinde Flow Sitometri

Mesane tümörlerinin erken gelişim safhalarında ürotelyal hücrelerde olan değişiklikler lümene dökülen hücreler incelenerek teşhis konabilir (6). Kanseroz özellikteki hücreler anormal derecede artmış olan DNA muhtevasına bağlı olarak büyük ve hiperkromatik nükleusa sahiptir (6, 7, 8).

İnceleme için ideal numune mesanenin 50 cc. Serum Fizyolojik (SF) ile yıkanması veya sistoskopi esnasında izotonik NaCl kullanmak kaydıyla evakuasyon yapılmasıyla alınabilir. Bu süspansiyon 24 saat buzdolabında tutulur. Hücre sedimenti 64 mikrometre naylon meshten filtre edilir. Bilahare santrifügasyon yapılır ve ml'de yaklaşık 100.000 hücre olacak şekilde Hank's dengeli solüsyonunda yeniden süspansiyone edilir (1, 6, 9, 10). Boyama işlemi için daha önce bahsedilen metakromatik akridine orange boyası tercih

edilir. Hücrelerin DNA ve RNA'sı boyanacaktır. Boyamanın spesifitesi ve kırmızı ile yeşil floresansın optik olarak ayrılması için işlemin mutlaka DNA ase ve RNA ase ile muamele edilmesi gerekir. Boyama sonucunda DNA yeşil, RNA ise kırmızı floresans verir. Ayrıca hücreler lazer ışınının önünden geçerken yeşil floresans atım süresi ölçülür. Bu kavram nükleusun çapı ile ilgilidir.

Spesimen analiz edilerek kompüterin grafik ve istatistik programlarından geçirilir. Her hücre için nükleer çapa göre DNA muhtevası bir scattergram halinde çizilir (6). Bu grafik, hücre çiftlenmesi ve küçük hücre yığınlarının, belirgin büyük nükleus görünümü ve DNA muhtevasındaki artışa bağlı olarak tesbitini sağlayarak değerlendirme dışında tutulmalarını sağlar. Polimorfonükleer lökositler de Triton X ile muamele edilince nükleuslarını salarlar ve katlanma göstermezler. Anormal şekilde düşük floresans veren, zayıf boyanan dejeneratif hücreler de elimine edilir. Periferik kan lenfositleri boyanarak ve incelenerek hastanın normal diploid DNA'sı belirlenir. PNL ve dejeneratif hücreler ekarte edildikten sonra geriye kalan hücrelerle yeniden RNA'ya karşı DNA şeklinde bir scattergram veya üç boyutlu histogram, istatistik için de tek boyutlu DNA ve RNA histogramları çizilir (7, 9, 10, 11).

Kanser hücreleri aneuploid olarak tesbit edilir. Bazı kanser hücrelerinde ise reaktif proliferasyon ve enflamasyonla karışabilen hiperdiploid ve tetraploid görünümüne olabilir. Bunların ayrımı şöyle yapılır: Kanserde popülasyonun en az % 15'i hiperdiploid olmasına rağmen reaktif proliferasyon veya enflamasyonda hiperdiploid oranı % 15'i nadiren aşmaktadır. Benign papillomlarda normal diploid DNA ve RNA miktarında artma vardır (6, 9, 10). En iyi neticeler flat karsinoma insituda bulunmuştur (İnvaziv karsinoma % 92, noninvaziv karsinoma % 86). Son zamanlarda DNA dışında başka parametreler de devreye sokulmuştur. Hücre yüzey antijenleri, intrasellüler komponentler gibi.

### Prostat Kanserlerinde Flow Sitometri

Mesane kanserindeki kadar olmamakla beraber prostat kanserinde de flow sitometri popülerite kazanmaktadır. Burada multiparametrik analizler yapmak

için intakt, canlı hücreler gerekmektedir. Prostat hücreleri biopsi alındıktan sonra ya enzimatik disosiyasyon ile ya da mekanik olarak karıştırılır. Artefakta yol açıp DNA ve hücre yüzey proteinlerinin boyalara karşı affinitesini değiştirebileceğinden enzimatik sistemden kaçınmak gerekir. Hücre süspansiyonu hazırlandıktan sonra trypan mavisi ile hücre hayatiyeti kontrol edilir.

Prostat kanserinde yapılan flow sitometrik analizde esas olarak tümörlerin DNA muhtevası, klinik, patolojik stage ve prognoz ile ploidi durumu arasındaki korelasyon araştırılır (12).

Biopsiler iyi alınır % 100 doğruluğa ulaşmak mümkündür. Kanser teşhisi flow sitometride anormal DNA histogramı ile konabilir. Ancak normal örneklerde aneuploidi ve büyüme fraksiyonundan % 10-15' daha büyük olması gibi anormallikler görülebileceği gibi tüm prostat kanserlerinde bu değişiklikler görülmez. Flow sitometrinin hassasiyetini artırmak için standart bir referans olarak malign olmayan prostat dokusunun DNA indexi kullanılmaktadır (Örnek DNA/Lenfosit DNA). Normalde bu index 1 olarak kabul edilir. Prostatın normal DNA indexi 1.04'tür.

**Prognoz Tayini:** Prognoz değerlendirilirken hastalar lokalize ve metastatik olmak üzere ikiye ayrılır. Lokalize hastalıkta progresyon riski olan kişileri uniform olarak tesbit etmek pek güvenilir olmaz. Negatif yönde elde edilen ploidi sonuçları da survivalin kötü olacağını göstermez. Yani lokalize hastalıkta flow sitometri % 100 güvenilir sayılamaz. Metastatik hastalıkta ise eğer aneuploidi varsa bu, survivalin kötü olacağı anlamına gelir. Aneuploidinin sadece eğer tümör çıkartılmazsa önemli olabileceği düşünülmektedir.

**Hastanın Takibi:** Aneuploidi çoğu zaman agresiv tümörlerin bir bulgusu olduğundan eğer hasta tedaviye cevap vermişse hiperdiploid tümör popülasyonunun azalması gerekir. Eğer hastadaki tümör başlangıçta

diploid ise tedaviye cevap verse bile kontrollerde de diploid olacaktır. Radyasyon tedavisi alan hastalar da aynı şekilde takip edilebilmektedir.

**Asit Fosfataz:** Flow sitometri ile hücrelerin özel florans boyalarla muamelesi ile ortaya çıkan bazı reaksiyonlar sonucunda floresansın emilim derecesine göre kantitatif olarak asit fosfataz seviyesi belirlenebilir. Ancak asit fosfataz seviyesi ile tedaviye cevap arasındaki korelasyonu gösteren çalışmalar daha yayınlanmamıştır (7, 8, 12).

### Sonuç

Flow sitometri ile yapılan kantitatif sitolojik analiz prostat kanserinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ancak ploidi tayininin yeterince hassas ve spesifik olmadığı anlaşılmıştır. Gleason skorundan ve tümör evrelemesinden bağımsız olarak önceden tahmin yapılabilir. Endokrin ve radyoaktif tedavi sonrası aneuploidinin sebat etmesi veya yeniden ortaya çıkması progresyonun erken habercisi olabilir.

### Testis ve Böbrek Tümörlerinde Flow Sitometri

Testis kanseri olan hastaların teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen bazı sub gruplarda stage belirleme ve optimal tedavi tesbitinde hala bazı tanımlamalar gerekmektedir. Stage I nonseminomatöz germ hücreli tümörü olan hastalarda problem olarak okült retroperitoneal veya uzak metastazların olması gibi. Bu metastazların % 30-40'ı mevcut teknikler ile belirlenemez (13). Bu hastalara günümüzde retroperitoneal lenfadenektomi, takip ve primer kemoterapi yapılmaktadır (1, 2, 13). Özellikle nonseminomatöz germ hücreli testis kanserlerinde flow sitometrik çalışmalar yapılmış ancak klinik stage belirlenememiştir (14).

Böbrek tümörlerinde ise flow sitometri ile ilgili bazı çalışmalar yapılmışsa da sonuçlar pek ümitvar olmamıştır. Bu konuda geniş araştırmalar halen sürmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Rosai J., M.D. Ackerman's surgical pathology. St. Louis: C.V. Mosby, 1989: 42-3.
2. Catalona W.J., M.D. Urothelial tumors of the urinarytract In: Walsh P.C., M.D., Retik A.B., M.D., Stamey T.A., M.D., Vaughan E.D., M.D. Campbell's Urology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992: 1113-4.

3. Lieberman M.W., Lebovitz R.M. Neoplasia. In: Kissane M.J. M.D. Anderson's Pathology. St. Louis: C.V. Mosby, 1990: 604.
4. Cotran R.S., M.D., Kumar V., M.D., Robbins S.L., M.D. Robbins' Pathologic basis of disease. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989: 301-2.
5. Başaran N. Tıbbi Genetik. İstanbul: Bilim teknik, 1986; 216-31.
6. Myron R. Melamed: Flow cytometry of the urinary bladder. Urol. Clin. North Am. 1984; 11(4): 599-607.
7. Jae Y. Ro, Gregg A. Staerckel, Alberto G. Ayala; Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol. Clin. North Am. 1992; 19(3): 435-53.
8. David Sidransky, Edward Messing; Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. Urol. Clin. North Am. 1992; 19(4): 629-37.
9. Frederick A. Klein and Frances K. It. White: Flow cytometry deoxyribonucleic acid determinations and cytology of bladder washings: Practical experience. J. Urol., 1988, 139: 275-8.
10. James B. Amberson and Julius P. Laino: Image cytometric deoxyribonucleic acid analysis of urine specimens as an adjunct to visual cytology in the detection of urethelial cell carcinoma. J. Urol., 1993, 149: 42-5.
11. Masaaki Tachibana, Nobuhiro Deguchi, Shirou Baba: Multivariate analysis of flow cytometric deoxyribonucleic acid parameters and histological features for prognosis of bladder cancer patients. J. Urol., 1991, (146): 1530-4.
12. Mitchell C. Benson, Kenneth Ring and John Giella: Flow cytometry in carcinoma of the prostate. Urol. Clin. North Am., 1990, 17(4): 885-91.
13. Judd W. Moul, John P., Foley, Charles L. Hitchcock: Flow cytometric and quantitative histological parameters to predict occult disease in clinical stage 1 nonseminomatous testicular germ cell tumors. J. Urol., 1993, 150: 879-83.
14. Mark S. Austenfeld, David L. Bilhartz, Ofer Nativ: Flow cytometric DNA ploidy pattern for predicting metastasis of clinical stage 1 nonseminomatous germ cell testicular tumor. Urology, 1993, 41(4): 379-83.