

23939

Gazi Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Patoloji Ana Bilim Dalı

HEPATOSELÜLER KARSİNOMA KİNETİĞİNİN
HİSTOPATOLOJİK, İMMÜNHİSTOKİMYASAL VE FLOVSİTOMETRİ
YÖNTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

Dr. Gülen Akyol

Araştırma Görevlisi

Uzmanlık Tezi

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2-6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7-17
4. BULGULAR	18-34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34-47
6. ÖZET	48
7. SUMMARY	49
8. KAYNAKLAR	50-60

GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (HSK) Asya ve Afrika'da batı ülkelerine oranla daha sık görülen oldukça kötü klinik gidişi olan solid, malign tümörlerdendir. Hastalığın prognozunu belirlemek amacıyla yapılan tek ve çok parametrelili klinikopatolojik analizlerle bugüne kadar tatmin edici bir sonuca ulaşılammıştır.

Histolojik olarak benzer olan tümörlerin biyolojik davranış bakımından farklılık gösterebildikleri bilinmektedir. Son yıllarda tümör kinetiğinin bu farklılıkta etkili olduğu üzerinde durulmaktadır.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D. arşivinde 1984-1990 yılları arasında HSK tanısı almış vakalar tekrar gözden geçirilerek histopatolojik karakterleri ortaya konmuştur. Hücre proliferasyonu analizinde kullanılan yöntemlerden immünhistokimya ve flovsitometri ile vakaların kinetik özellikleri incelenmiştir. HSK'ların proliferasyon kapasiteleri bakımından farklılıkları olup olmadığı; bu farklılığı ortaya koymada hangi parametrelerin anlamlı ve hangi yöntemin daha kullanılabılır olduğu araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hepatosellüler karsinom (HSK), coğrafi epidemiyolojisi ile dikkati çeken, Sahra'nın güneyindeki Afrika ülkeleri ile güneydoğu Asya ülkelerinde sık görülen bir neoplazmdır (1,2,3,4,5). Erkeklerde kadınlara oranla 2-4 kez daha sıklıktır. Yaygın olduğu ülkelerde üçüncü dekat, batılı ülkelerde daha ileri yaşlarda (5-6. dekatlarda) görülür (2,3,5).

Hepatotropik virüslerin, HSK karsinogeneğinde onkogen gibi görev almasalar da etkili oldukları bilinmektedir (1,2,3,4,5,6). Aflatoxinler başta olmak üzere mikotoksinler, nitrozaminler, organoklorin pestisidler, androjenik anabolizan steroidler, oral kontraseptifler gibi kimyasal karsinojenler, kronik alkol kullanımı, hemakromatozis, konjenital atreziye sekonder biliyer siroz gibi kronik karaciğer hastalıkları; ayrıca α -1 antitripsin eksikliği, tirosinemia, çocukluk çağının kolestatik sirozu gibi doğumsal ve genetik hastalıklar, toryum dioksidin radyoaktivitesi, parazitik hastalıklardan şistozomiazis etyolojik faktörlerdir (1,2,3,7).

Karaciğer lezyonlarında yapılan immünohistokimyasal ve morfolometrik çalışmalarla; sirotik karaciğerde görülen adenomatöz proliferatif nodül, nodüller rejeneratif hiperplazi ve özellikle küçük hücreli displazinin pre-neoplastik kabul edilebileceğı sonucuna varılmıştır (2,4,6,8).

Son yıllarda makroskopik klasifikasyon önem kazanmış ve prognozu belirlemede anatomik tiplendirmenin gerekliliğinden

söz edilmeye başlanmıştır (9). Yaygın olarak kullanılan Eggel'in önerdiği basit tiplendirmeden başka, Okuda ve arkadaşları(9) 1984'de yeni bir sınıflandırma yapmışlardır. Bu sınıflandırmanın Eggel'in sınıflandırmasına üstünlüğü tümörün büyüme şekli ile çevre karaciğer dokusu arasındaki ilişkiyi vermesidir (9,10,11).

Makroskopik olarak tümör genellikle sağ lobda lokalize, yumuşak kıvamlı, hemorajik odaklar içerebilen ve içerdği safra nedeniyle boyanmış bir kitle oluşturur. İntrahepatik damarlara yayılım eğilimi fazladır (1,2,3,6). Bu daha sonra ekstrahepatik damar yayılımına yol açar. Safra duktusları boyunca yayılımı daha nadirdir. Lokal invazyon ve bölgesel lenf nodüllerine metastaz sıklıkla görülür.

HSK mikroskopik olarak normal hepatositlere çok benzeyen hücrelerden oluşur (1,2,3,12). Stroma tipik olarak azdır. Edmondson ve Steiner'in(13) tümör hücrelerinin nükleus ve sitoplazma özellikleri, birbirleri ile olan ilişkileri ve fonksiyonlarını değerlendirerek yaptıkları sitolojik derecelendirme artık yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Bugün daha çok iyi - orta - az ayrılaşmış terimleri kullanılmaktadır (2,5,12,14).

Ultratrüktürel özellikleri normal hepatositlere benzer. Tümör hücreleri ile çevrelenmiş kanalikül görülmesi spesifiktir (2).

HSK oldukça kötü prognozlu bir tümördür. Prognostik belirleyici olarak klinik, biyokimyasal, morfometrik parametreler kullanılmaktadır (2,3,14,15,16,17,18).

Histopatolojik tiplendirmenin ve derecelendirmenin prognostik anlamı olmadığı bilinmektedir (2,3,14).

Yaş, ensefalopati, BUN değerleri, alkol kullanımı araştırılan parametrelerden bazılarıdır.(15,16) Okuda ve arkadaşlarının (17) 1984'de yaptığı klinik evreleme tümörün boyutuna (karaciğerin %50'sinden büyük olup olmamasına göre), asit varlığına, serum albuminin 3g/dl.'den az yada çok olmasına ve serum bilirübin düzeyinin 3mg/dl.'den yüksek olup olmamasına dayanır.

Ekstrasellüler matriks antijenleri (EMA) bir çok neoplazide invazyon kapasitesini, tümörün agresivitesini değerlendirmek için kullanılmaktadır (19). Tümörün ayrışması azaldıkça bazal membran antijenlerinin boyanması da azalır. C-IVase bazal membran elamanlarından c-IV'ü degrade eder. proliferasyon belirleyicilerinden Ki-67 ile c-IVase enzimine yönelik monoklonal antikorlarla yapılan çalışmada tümörün ayrışmasının azalması oranında bu iki proteinin boyanma oranlarının arttığı saptanmıştır (19).

HSK'da nükleer DNA içeriği ile ilgili çalışmalarda anaploidinin kötü prognoz belirleyicisi olduğu saptanmıştır (20,21,22,23,24).

Sayıları kabarık olmasına rağmen klinikopatolojik parametrelerden hiçbiri tek başına HSK'un biyolojik davranışının belirlenmesinde söz sahibi değildir. Son yıllarda tümörlerde hücre popülasyonu ve kinetiğinin bilinmesinin tümörün büyüme hızı, yayılım kapasitesi ve ilaçlara duyarlılığını belirlemede yardımcı olabileceği

düşünülmektedir (25,26,26,27,28). Benzer çalışmalar HSK lar için de yapılmaktadır.



GEREÇ VE YÖNTEM

1984-1990 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına gelen hepatosellüler karsinoma (HSK) tanısı almış 10 vaka tekrar incelendi.

1. Klinik ve Histopatolojik Değerlendirme:

Hastalar yaşları, cinsiyetleri ve klinik bulguları açılarından değerlendirildi. Hepsi insizyonel biyopsi materyali olan parafine gömülmüş dokular tekrar Hematoksilen-Eozin (H.E.) ile boyanarak incelendi. Gerekli görülenlerde diastazlı/diastazsız PAS ve Gomori retikülin boyaları uygulandı.

Kesitlerde hücre sitoplazma ve nükleus özellikleri, tümörün yapılanma biçimi, ayrılaşma derecesi, mitotik aktivite, nekroz ve çevre dokuların varlığı değerlendirildi.

Normal karaciğer hücresine ve yapılanmasına benzerlik derecelerine göre ayrılaşmaları iyi-orta-az olarak değerlendirildi (12).

2. Proliferasyon kapasitesinin değerlendirilmesi:

Hücre proliferasyon analizinde kullanılan yöntemler şöyle sıralanabilir (1,25,26,28,29,30):

- i. Mitotik figürlerin sayılması.
- ii. [3 H] timidin ile işaretleme
- iii. İmmünohistokimyasal olarak nükleer antijenleri saptama
- iv. Flovsiometri ile kantitatif değerlendirme

Bu çalışmada timidin ile işaretleme dışında diğer üç yöntem kullanılarak vakaların proliferatif özellikleri belirlendi.

A. Mitotik Aktivite: Bu değerlendirme için her büyük büyütme alanındaki mitozlar tipik, atipik ayrımı yapılmadan sayıldı ve ortalamaları alındı. Biyopsi materyalleri eşit büyüklükte olmadığı ve eşitlemek olanağı da olmadığından her materyalde aynı miktarda alan sayılamadı. Yarı kantitatif bir değerlendirme ile mitoz sayısı ortalama her büyük (x40) büyütme alanında 0-1 olan seyrek, 2-3 orta, 4 ve daha fazla olan da sık olarak tanımlandı.

B. immünhistokimyasal Analiz: immünhistokimya basit anlamda, doku ve hücrelerin immünolojik prensiplere ve tekniklere dayanılarak incelenmesidir (1,25). Antiijenik zellik gösterebilen çekirdek, sitoplazma ya da hücre yüzeyine ait her türlü eleman uygun antikorla bağlanıp, bu reaksiyon bazı belirleyici enzimlerle kuvvetlendirilip, boyanarak ışık mikroskobu düzeyinde görünür hale getirilir. Bu yöntem immünfloresan tekniklerine oranla 1) zel bir mikroskop düzeneğı gerektirmemesi 2) kalıcı kesitler sağlanabilmesi 3) doku morfolojisini bozmaması nedenleriyle daha avantajlıdır (25). Ayrıca, dondurulmuş kesitlerde, en iyisi formalin olmakla birlikte, diğer solusyonlarda fikse edilip parafine gömülmüş dokularda, sitolojik inceleme yapılan materyallerde de çalışılabilmesi geniş kullanım olanağı sağlamaktadır (1,25).

immnboyama tekniğı oldukça uzun bir süredir bilinmekle birlikte özellikle monoklonal antikorların geliştirilmesi ile son 10 yıldır patoloji laboratuvarlarında çok amaçlı

kullanılmaya başlanmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar tanı koymada, etyolojik ve prognostik etkenlerin araştırılmasında, tedavi izleminde yardımcıdır (25).

İmmünboyamanın başarısı antijenik bölgelerin görünür hale getirilmesi işlemine dayanır. Boyama protokolundaki işlemler spesifik ve nonspesifik olmak üzere iki aşamalıdır. Spesifik aşama; sorgulanan antijene yönelik antikorun materyale uygulanması aşamasıdır. Bu antikorlar monoklonal ve poliklonal olmak üzere iki tiptir (1,25). Poliklonal antikorlar ; bir antijene ait birden fazla epitopa yönelik heterojen bir popülasyondur. Buna karşılık monoklonal antikorlar bir antijenik epitopa spesifik homojen antikor popülasyonudur. Poliklonal antikorlar daha yüksek duyarlılık gösterirken, monoklonal antikorlar da yüksek spesifite sağlarlar.

Dokudaki antijen ile uygulanan antikor, ki buna "birincil-primer" antikor adı verilir, birleştikten sonra bu reaksiyonun kuvvetlendirilip görünür hale getirilmesi gereklidir. Bu amaçla antijen-antikor kompleksi enzimlerle işaretlenir, daha sonra reaksiyona eklenen renk verici madde (-kromojen) ile renkli bir son ürün oluşturulur.

Nonspesifik aşamada istenmeyen boyanmaların önlenmesine yönelik endojen enzim ve protein blokajı yapılır.

Boyama yapılırken, hem antikor kalitesini, hem de uzun boyama protokolu sırasındaki aksaklıkları saptayabilmek amacı ile pozitif ve negatif kontrol kesitleri kullanılmalıdır (1,25). Negatif kontrol kesitleri, boyanmanın spesifik olup

olmadığını ortaya koyar. Primer antikorun uygulanması dışında tüm protokol aynıdır. Primer antikor yerine yıkama solusyonu ya da ileri derecede dilüe serumu önerenler vardır.

Pozitif kontrol kesitleri ise primer antikorun ve kullanılan yöntemin çalışıp çalışmadığını kontrol etmeye yarar. Bu kesit genellikle araştırılan antijenin kesin olarak var olduğu bilinen bir dokudan hazırlanır.

Tüm vakalardan immünhistokimyasal inceleme için 4 mikronluk kesitler alındı. İndirekt yöntemlerden avidin-biyotin sistemi kullanıldı. Kullanılan antikor "anti-PCNA" Ig G türünde monoklonal idi ve kullanmadan önce dilüsyonu gerektirmiyordu. [anti-PCNA Path Mark/ Coulter Clone-6604542]

Yöntem:

1. 4 mikron kalınlığındaki kesitler 56° C'lık etüvde 30 dk. tutuldu.
2. 15 dk. ksilolde bekletildi.
3. Her birinde ikişer dk. bekletilerek sırasıyla %100, %95, %90'lık etil alkolden geçirilerek hidrasyonları yapıldı.
4. Distile suda iki kez çalkalandı.
5. Birincil (primer) antikor (anti-PCNA) kesitleri kapatacak şekilde uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi.
6. Fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (-FTS) ile 3 kez yıkandı.
7. Biyotine bağlanmış bağlayıcı (sekonder) antikor ile 30 dk. inkübasyon yapıldı.
8. FTS ile yıkandı.

9. Avidin-biyotin kompleksi uygulanarak 30 dk. bekletildi.
10. Tüm kesitler FTS ile yıkandı.
11. 5 dk. süreyle renk vermesi amacıyla DAB (diaminobenzidin tetraklorid) uygulandı.
12. Kesitler çeşme suyunda yıkandı.
13. Zemin boyaması için çabuk boyama yöntemi ile 15 dk.da hematoksilin ile boyandı.
14. Dehidrasyon için sırasıyla %90, %95, %100'lük alkolde ikişer dk. tutuldu, ksilolde şeffaflaştırıldı, balsamla kapatıldılar.

Sonuçta kontrol adenokarsinom ve diğer (+) boyanmış kesitlerde nükleuslarda koyu kahverengi renk değişikliği gözlemlendi. Pozitif doku kontrolünden başka her vakada birincil antikorun uygulanmadığı negatif kontrol boyama yapıldı. Boyanma derecesi yarı kantitatif bir yöntemle değerlendirildi. Pozitif boyanan hücrelerin tüm tümör dokusuna oranı belirlenerek vakalar +1 den +4 e kadar değerlendirildi. Her büyük büyütme alanındaki boyanmış nükleusların total nükleus sayısına oranı belirlenip her vakada ortalaması alındı. Boyanmış nükleus oranı % 0-25 ise +1, 26-50 ise +2, 51-75 ise +3, 76-100 ise +4 olarak değerlendirildi.

Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı antikor, avidin-biyotin kompleksi, DAB ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindeydi.

C. Flovsiometri (-Flowcytometry- FCM): FCM, kısaca akıcı bir sistemde hücre parametrelerini otomatik olarak

ölçen bir yöntemdir. Bu amaçla 1960'lı yıllarda John Hoffer(31) ve Herbert Derman(31) tarafından yapılan ve hücre nükleik asitlerine bağlanan floresansı otomatik olarak saptayan "sitoflorografi" denilen alet kullanılıyordu. Ancak bu analiz statik olarak cam üzerinde yapılıyordu. Günümüze kadar tıp ile birlikte mühendislik, fizik, bilgisayar teknolojisi, matematik ve biyolojide olan gelişmeler ile kantitatif sitolojide bugün kullandığımız gelişmiş, bilgisayarlı sistemlere kadar gelindi.

FCM alet sisteminde esas olay floresansı ölçmek ve kaydetmektir (31,32,33,34). Bu ölçümler uyarım kaynağı önünden, uygun florokrom ile boyanmış, akan hücre partiküllerinde yapılır. Partiküllerin içerdikleri floresans düzeylerinin ölçülmesi en sık kullanılan "hücre dışı" (ekstrensek) parametredir (31,32,33). Akmakta olan hücrelerin dik ve düz ya da küçük bir açıyla yansıttıkları ışın yoğunluğu ise ölçülen "hücre içi" (intrensek) parametreleri oluştururlar. Düz olarak yansıtılan ışınlar hücrenin boyutu, dik açıyla yansıtılanlar ise sitoplazma granülleri gibi hücre yapı elemanları hakkında bilgi verirler (31,32,33). Herhangi bir hücre elemanına bağlanmış, floresanla işaretlenmiş, monoklonal antikorlar yine verdikleri floresansın saptanmasıyla hücre dışı parametreler grubunda incelenebilirler (31,33,34,35). En büyük avantajı, kantitatif sonuçlar sağlaması ve tek bir hücrenin bile analizini yapabilmesidir.

FCM için gerekli temel oluşumlar :

I. Hücre suspansiyonunun hazırlanması ve uygun florokromla boyanması; Kan, vücut sıvıları, kemik iliği aspirasyonu ve tüm organlardan materyal hazırlanabilir. İnce iğne aspirasyon tekniği ile alınan biyopsi ve aspiratlarda da çalışılabilir (31,33).

Önceleri sadece taze materyal kullanılırken, bugün parafine gömülü arşiv materyallerinde de çalışmak olasıdır (31,33,34,35,36,37). Doku örneği ezilip, dövülerek mekanik olarak parçalanır. Bu işlem genellikle hücreler arası bileşkeleri zayıf lenfoid doku için yeterli olmakla birlikte daha solid dokularda enzim ve/veya deterjan etkisine gereksinim olabilir. Parafine gömülü dokularda bunların öncesinde 30-50 mikron kalınlığındaki kesitlerin deparafinizasyonu, enzimatik degradasyonu ve giderek düşen dereceli alkollere sokularak nükleusun rehidrasyonu yapılmalıdır (31).

Yapılacak çalışmanın amacına uygun olarak nükleusu ya da ilgili hücre komponentini boyayacak florokrom seçilmelidir (31,33). DNA, RNA veya bir proteinin ölçüleceği tek parametrelili çalışmada DNA için sıklıkla propidyum iyodid (PI), etidyum bromid (EB) kullanılır. Bu boyalar verilmeden önce RNA'ya non-spesifik bağlanmayı önlemek için "RNase" uygulanır. RNA analizlerinde ise daha çok akridin oranj kullanılmaktadır (31,33). Monoklonal antikorlarla birlikte yapılan çalışmalarda ise floresein izotiyosiyanat (FITC) en sık kullanılan florokromdur. Birden fazla parametrenin

değerlendirildiği durumlarda farklı dalga boylarında floresans veren iki değişik florokrom gereklidir.

Boyanan hücre ya da nükleus suspansiyonu laminal akımla, yani tek sıra halinde basınçlı gaz etkisiyle 100-1000 hücre/sn hızla bölmeden geçerler.

Yöntem:

Bloklardan FCM ile analiz için 4 adet 50 mikron kalınlığında kesit 10 ml.lik cam tüplere alındı.

1. Parafinden kurtulmak için her tüpe 10 ml. ksilol kondu ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bu işlem iki kez yapıldı.
2. Sırasıyla %100, %95, %70, %50'lik alkollerden 10ar ml. eklenerek 10ar dk. bekletildi.
3. Dokuların tümüyle alkolden temizlenmesi için her tüpe 10ml. distile su eklenip kapakları kapalı oda sıcaklığında bir gece bekletildi.
4. Ertesi gün bekletilmiş distile su dökülerek 10ml. taze distile suda 10dk. bekletildi.
5. Dokunun enzimatik parçalanma işlemi için distile su döküldükten sonra %5'lik pH'sı 1.5 olan pepsin solüsyonundan her tüpe 1.5ml. konup karıştırıldıktan sonra tüpler 37° C lık sıcak su banyosunda 5 er dakika ara ile karıştırılarak 30dk. inkübe edildi. Hücrelerin ayrışmaya başlaması solüsyonun bulanıklaşması izlenerek kontrol edildi.
6. Süspansiyon 52 mikronluk naylon filtreden geçirildi.
7. Hazırlanan materyalde otomatik hücre sayımı yapıldıktan

sonra 25dk. süreyle 1000rpm.de santrifüj edilerek boyama aşamasına geçildi.

8. DNA boyası olarak propidyum iyodid kullanıldı. Bu flöorasansın RNA'ya bağlanmasını önlemek amacıyla boya solüsyonu RNase içeriyordu. Solüsyon 37° C'a ısıtılıp, her tüpe 10ml. eklendi, 10sn. karıştırıldı.

9. 30dk. 37° C'da inkübe edildi.

10. 5dk. 1000rpm.de santrifüj edildi ve RNase içermeyen, soğuk propidyum iyodid solüsyonu eklendi.

11. 37 mikronluk naylon filtreden geçirilerek FCM aletine kondular.

II. Uyarım kaynağı-Optik sistem-Elektrik akımı oluşumu ;

Akmakta olan hücreleri uyaran ışık kaynağı olarak genellikle lazer kullanılır. Lazer, hücreleri uyarak ışık sinyaller ve eğer var ise işaretli hücrelerin floresans yaymasına neden olur (31,33,34). Böylece lazer uyarımı ile oluşan floresan sinyaller düz ışık yansıması ve dik ışık yansıması, lensler aracılığı ile fotodedektörlerde toplanır. Birden fazla parametre çalışıldığında farklı floresansların ayırımının yapılmasında filtrelerin yardımı olur.

Oluşan optik sinyaller şöyle sınıflanır:

- a) Düz Açı Işık Yayımı-Forward Angle Light Scatter(FALS);
Lazerden çıkan ışının aynı ekseninde devam etmesi ile toplanan ışıktır. FALS, hücre boyutu ile oranlıdır ve onun hakkında bilgi verir.
- b) Dik Açı Işık Yayımı-Right Angle Light Scatter(RALS);
Lazerden çıkan ışının 90° açıyla toplanmasıdır. Hücrenin

yapısı, içeriği hakkında bilgi edinmede yardımcı olur.

c) Birden Fazla Parametre; iki ya da daha fazla sinyalin farklı floresan ölçümleri ve iki ayrı ışık yayımı şeklinde toplanmasıdır.

90 derecelik açı kullanarak diğer hücre artıkları ve kıvrımlanmış nükleuslar çalışma dışı bırakıldı ve uygun programla, sadece tek nükleuslu hücreler değerlendirmeye alındı.

III. Elektrik sinyallerin dijitalize olması ve bilgisayarla değerlendirilmeleri ;

Elektrik sinyalleri "analog dijital çevirici" sistemde dijitalize edilir. Buraya ulaşan sinyaller genellikle 0-8 voltur. Analog dijital çevirici bu 8 voltluk spektrumu kanallara böler ve pik amplitüdü verir. Mikrobilgisayarda bu veri ile her kanala ait hücre sayısı ilişkisi incelenir.

FCM aleti ayrıca dışarıda bir bilgisayara bağlanarak verileri toplanıp saklanabilir ve histogramlar hazırlanabilir.

Tek parametrelili histogramda araştırılan parametre x-ekseni, hücre sayısı y-ekseninde gösterilir. İki parametrelide ise parametrelerden biri x, diğeri y ekseninde gösterilir. Hücre sayısı ise düzlemdeki noktalar ile belirlenir.

FCM'de kullanılan hücresel parametreler ise şöyle özetlenebilir (32):

1- Neoplastik değişimin belirleyicisi olarak kullanılan hücre DNA içeriği.

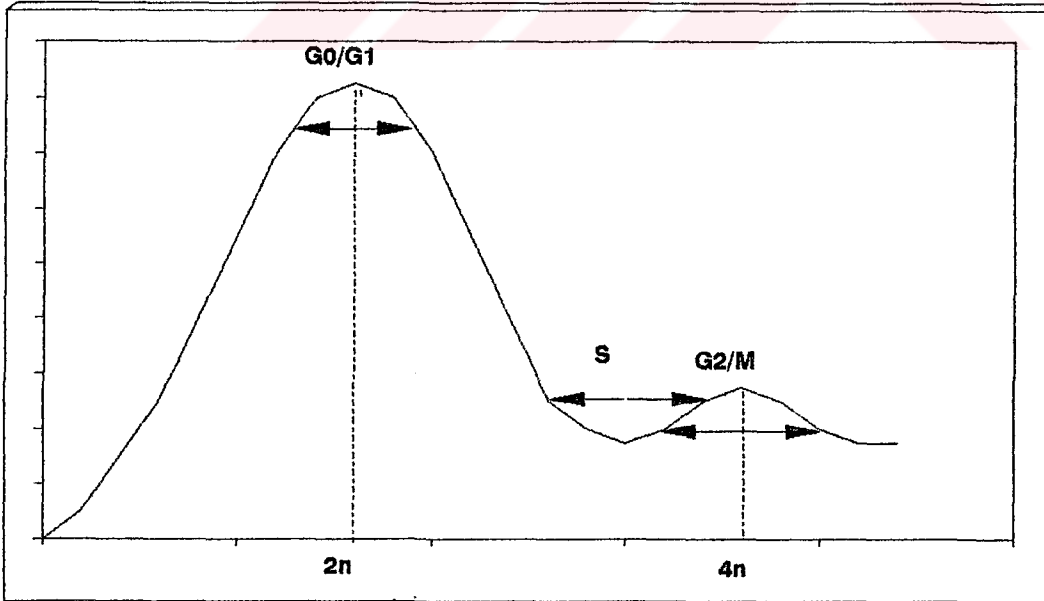
2- Fenotipik belirleyiciler olarak RNA, sitoplazmik

oluşumlar, hormon reseptörleri.

3- Sitokinetik belirleyiciler olarak büyüme fraksiyonu, siklus dinamiği ve evrelerin dağılımı.

Solid tümörlerde FCM en çok prognozda etkili olduğu düşünülen hücre DNA içeriği ve siklus analizinde kullanılmaktadır (31,34,35,38,39).

Normal dokularda hücrelerin yaklaşık %90'ı dinlenme fazı olan G0 ve/veya interfaz yani G1 fazında olup DNA içerikleri $2n$ yani diploiddir. Küçük bir grup hücre iki katı fazla yani $4n$ DNA içerirler ve tetraploid olarak adlandırılırlar. Bu hücreler DNA sentezini tamamlamış ama henüz mitozu başlanmamış G2 fazına ait hücrelerdir. Sentez - S fazında olan hücreler ise bu iki grup hücre arasında olup DNA içerikleri $2n - 4n$ arasındadır. (Şekil 1)



Tümörler kabaca diploid ve anoploid olarak ayrılırlar.

DNA indeksi ploidiyi kantitatif olarak belirlemede kullanılan

bir parametredir. Anormal G0 / G1 piki hücrelerinin, diploid G0 / G1 hücrelerine bölünmesi ile hesaplanır.

$$\text{DNA indeksi} = \frac{\text{Anormal G0 / G1 hücre popülasyonu floresansı}}{\text{Diploid G0 / G1 hücre popülasyonu floresansı}}$$

DI; diploid tümörlerde 1.0 (0.9 - 1.10), hipoploidlerde 0.9'dan küçük, hiperploidlerde 1.10 - 2.10, hipertetraploidlerde ise 2.10'dan büyüktür.

Solid tümörlerde kullanılan hücre siklus analizi hazır bilgisayar programları ile her siklus kompartmanındaki hücreleri saptamaya dayanır.

Alet; Coulter Electronics firmasının "Epic Elite Flow Cytometer" modeliydi. Işın kaynağı 488nm. eksitasyon veren 15mW. argon lazerdi. DNA indeksi ve hücre siklus dağılımı ile ilgili bilgiler "Phoenix Flow Systems" in "multicycle" adındaki analiz programı ile yapıldı.

IV. Kontroller : DNA ölçümlerinde floresans derecesi bilinen bir hücre popülasyonu olarak normal periferik kan lökositleri ya da tavuk çekirdekli eritrositleri eksternal diploid hücre kontrolü olarak kullanılır. Internal standart olarak ise aynı hastadan, aynı koşullarda işlem yapılmış, aynı dokudan örnek kullanılır. Bu amaçla genellikle tümöre komşu non-tümöral doku kullanılır.

Doku içi kontrol olarak tümöre komşu karaciğer parankimi, eksternal kontrol olarak insan diploid lenfosit süspansyonu kullanıldı. Diploid G0-G1 pikinden başka bir pik olduğunda anaploid olarak yorumlandı.

BULGULAR

Çalışmaya katılan hastaların 8'i erkek, 2'si kadındı. (E/K:4/1) Kadın hastalardan birinin yaşı bilinmiyordu. Diğerlerinin yaşı 41-73 arasında olup, ortalama 61.3 idi. Klinik olarak 1 ila 6 ay arasında değişen süredir var olan nonspesifik sindirim şikayetleri ile başvurmuşlar, biri mide ülseri, biri mide kanseri, diğerleri de hepatoma öntanılarını ile opere edilmişlerdi. Tüm hastalardan insizyonel karaciğer biyopsisi gönderilmişti. Bir hastada HBs Ag pozitifliği saptanmıştı. Diğer hastaların laboratuvar bulgularında önemli bir özellik saptanmadı.

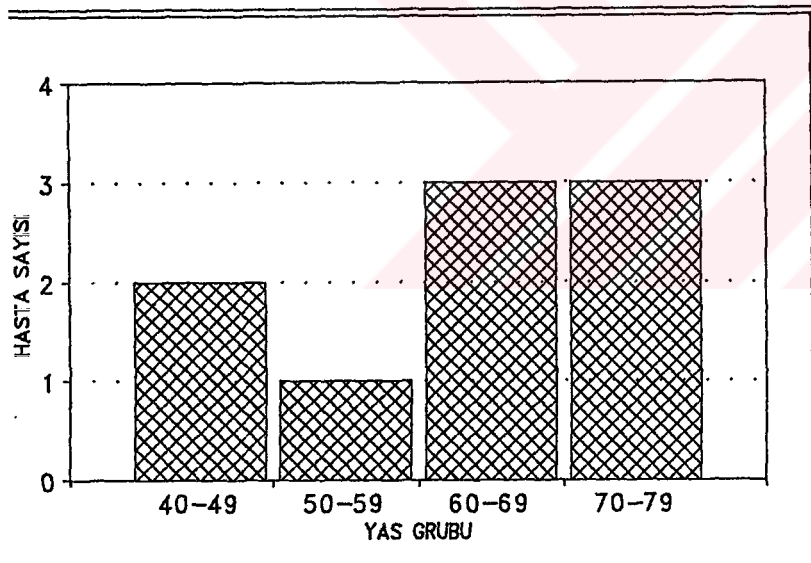
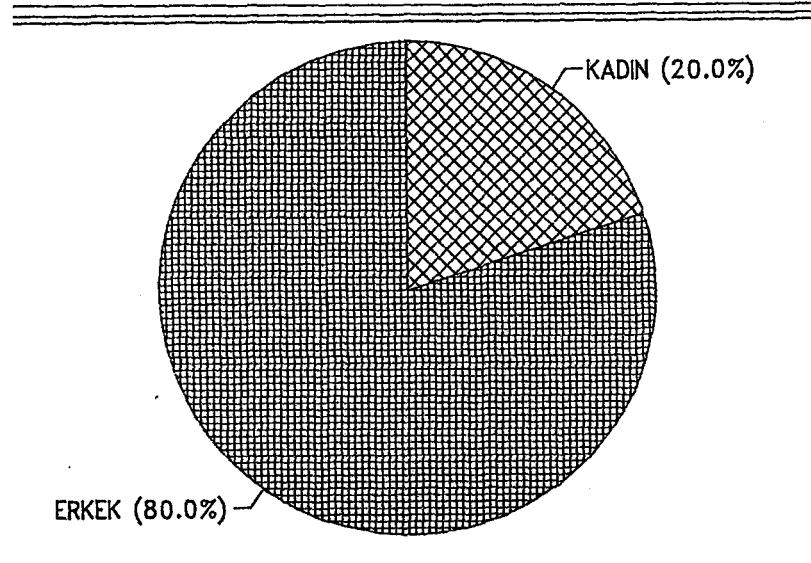


Diagram 1:

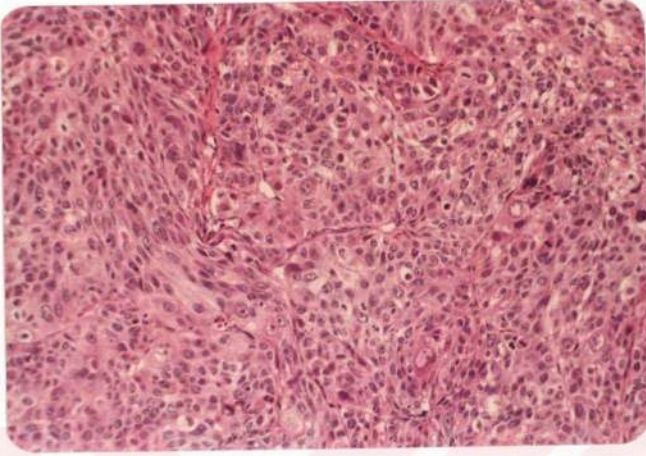
Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.



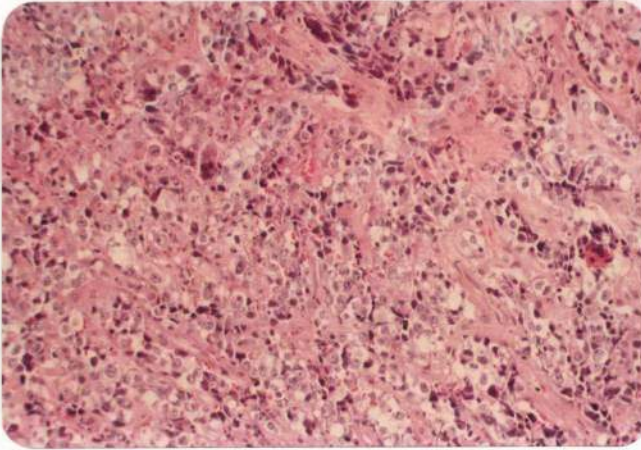
Tümör hücreleri bir kısım vakada poligonal, nükleusları veziküler, bir yada daha fazla belirgin nükleollü, sitoplazmaları granüler, normal hepatositlere göre daha bazofilik boyanmış görünümde normal hepatositlere benzer görünümdeydiler. Daha yüksek oranda ise, nükleus ve hücresel boyut, boyanma ve şekil bakımından farklılıklar gösteren, mono ve mültinükleer dev hücrelerle karakterli, bir kısmı koyu hiperkromatik nükleuslu, eozinofilik, dar sitoplazmalı hücrelerle karışık halde olan pleomorfik tip hücresel yapılanma görüldü. Bazı tümörlerde daha az olmak üzere şeffaf sitoplazmalı hücreler de gözlendi. Bir vakada hemen tamamı neredeyse yağ hücrelerine benzer görünümde, nükleusu periferite itilmiş, sitoplazmaları boyanmamış hücrelerden oluşan görünüm vardı ki bu, "ksantoma benzeri" olarak tanımlandı. Bir vakada siroz zemininde gelişmiş odaklar tarzında tümöral yapılanma izlenmiş ve bu tümörde retikülün boyası uygulanmıştır.

Histolojik yapılanmaları en sık olarak kalın, çok tabakalı kordonlar oluşturur tarzda, ara bağ dokusunun az olduğu, arada sinüzoidlerin gözlendiği trabeküler tipte idi. Daha seyrek olarak karışık halde fokal asiner yapılar gözlendi. Bir kısmında ise trabeküler yapılanma kaybolup daha solid kitleler halinde kompakt yapılanma saptandı. Bir vakada kalın fibröz bantların varlığı gözlendi.

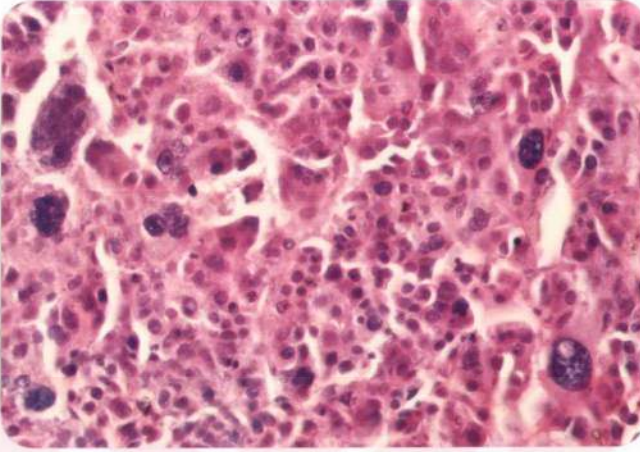
Vakaların 6 tanesinde tümörün yanısıra zeminde aktif siroz veya hepatitik alanlar içeren karaciğer dokusu vardı.



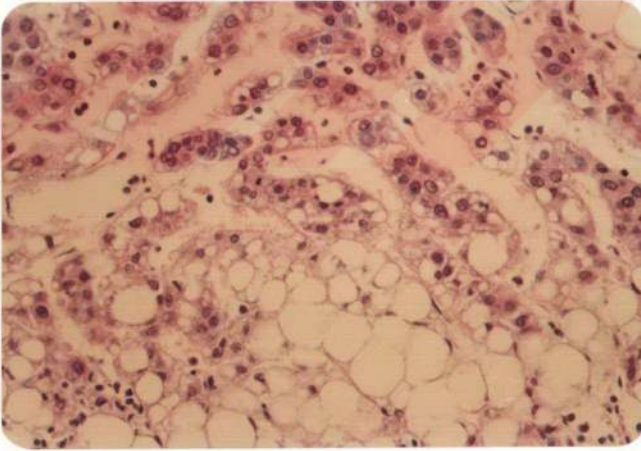
Resim 1: Kompakt yapılanma gösteren sık mitoz içeren HSK.
H.E.x 20.



Resim 2: Şeffaf sitoplazmalı hücreler ile daha az oranda
hiperkromatik nükleuslu dar sitoplazmalı hücrelerden oluşan
karışık tipte HSK. H.E.x 20.



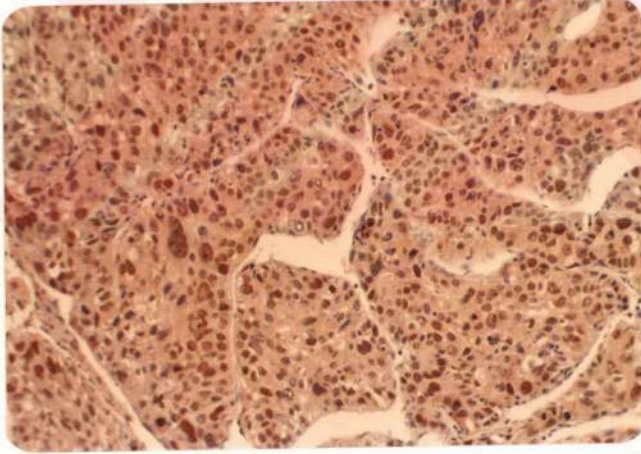
Resim 3: Pleomorfik tipte HSK'da multinükleer dev hücreler. H.E.x 40.



Resim 4: Büyük kısmı "Ksantoma" benzeri, yer yer normal karaciğer hücrelerine benzer "hepatositik" alanlar içeren HSK. H.E.x 10.

Tablo 1'de hastaların yaşı, cinsiyeti ve histopatolojik özellikleri özetlenmiştir. (Bkz. diagram 2)

Anti-PCNA ile boyanmış kesitlerde, kahverengi renk değişikliği tüm nükleusda yaygın koyu görünümünden ince granüller halinde nükleer membran altında belirginliğe kadar değişebiliyordu. Veziküler, hiperkromatik veya dev hücre nükleuslarında boyanma olmasına rağmen mitotik hücrelerde boyanma gözlenmedi. Çevre siroz yada hepatitik karaciğer dokularında boyanma gözlenmedi ve bu alanlar internal negatif doku kontrolleri olarak değerlendirildi. Bir vakada teknik olarak boyanma sağlanamadığı için değerlendirme yapılamadı.

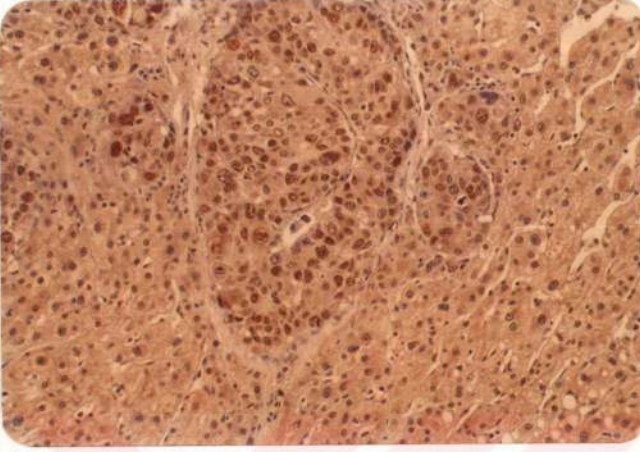


Resim 5: PCNA ile koyu kahverengi (+) boyanmış çok sayıda nükleusun izlendiği HSK-immünohistokimya ABCx 20.

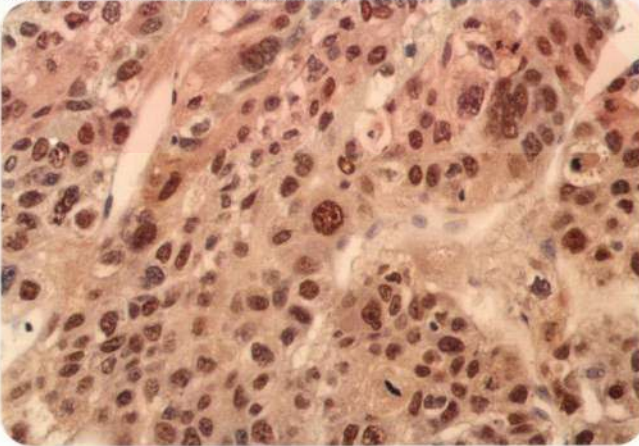
TABLO 1

Hasta No	C i n s	Y a ş	Histolojik Tip Sitolojik/ Yapılanma	Ayrımlaşma dere- cesi	Mitoz	Nekroz Çevre
1. 84-8794	E	70	pleomorfik/ trabeküler+ asiner	az	sık	+ -
2. 86-1091	E	73	hepatositik/ trabeküler	orta	seyrek	- ⁺ (hepatit)
3. 88-2324	E	67	pleomorfik/ kompakt	az	sık	+ -
4. 88-2270	K	--	pleomorfik/ kompakt	az	sık	+ -
5. 89-2532	E	56	pleomorfik/ trabeküler + asiner	az	sık	- -
6. 87-3440	E	41	hepatositik/ kompakt	orta	seyrek	- ⁺ (siroz)
7. 84-1047	E	45	pleomorfik/ trabeküler	orta- az	seyrek	+ ⁺ (siroz)
8. 85-107	E	65	pleomorfik/ kompakt+fib- röz bantlar	orta- az	orta	- ⁺ (siroz)
9. 88-2174	K	70	şeffaf/ ksantoma benzeri	orta	seyrek	- ⁺ (hepatit)
10.87-2647 *	E	65	şeffaf/ trabeküler hepatositik	iyi	-	- ⁺ (siroz)

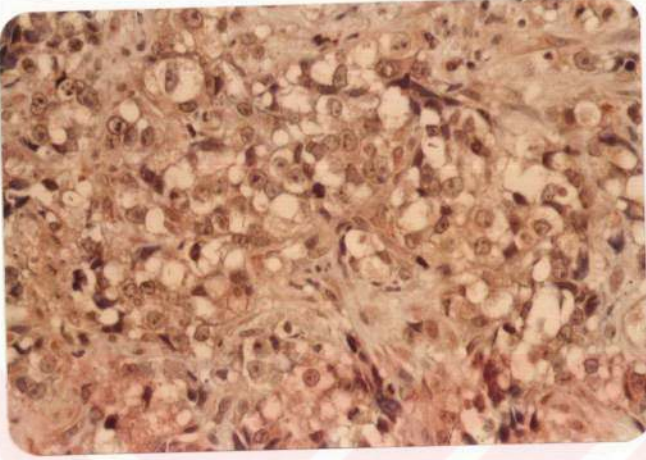
* Gümüş boyası ile tümör odaklarında retikülün çatıda kollaps saptandı.



Resim 6: PCNA ile boyanmış nukleusların sadece ortadaki tümör alanında ve çevredeki küçük tümöral odaklarda varolduğu non-tümöral karaciğer hücrelerinde nukleusların boyanmadığı izlenmektedir. İmmünohistokimya- ABCx 20.



Resim 7: PCNA ile koyu, kaba granüller tarzında boyanmış nukleuslar. Mitotik figürün boyanmadığı izleniyor. İmmünohistokimya-ABCx 40.



Resim 8: PCNA ile nukleuslardaki boyanmanın nukleoplazma altında belirgin, ince toz halinde spesifik olduğu izleniyor. immünhistokimya-ABCx 40.

Tablo 2 vakaların PCNA ile boyanma derecelerini özetlemektedir. (Bkz. diagram 3)

TABLO 2

Hasta No	PCNA Boyanma Derecesi
1. 84-879	+ 3
2. 86-1091	+ 1
3. 88-2324	+ 3
4. 88-2270	+ 3
5. 89-2532	+ 4
6. 87-3440	t.h. *
7. 84-1047	+ 2
8. 85-107	+ 1
9. 88-2174	- - #
10. 87-2647	+ 1

* : t.h.= teknik olarak doku boyanamadı

: tümörde hiç (+) boyanmış nükleus saptanmadı

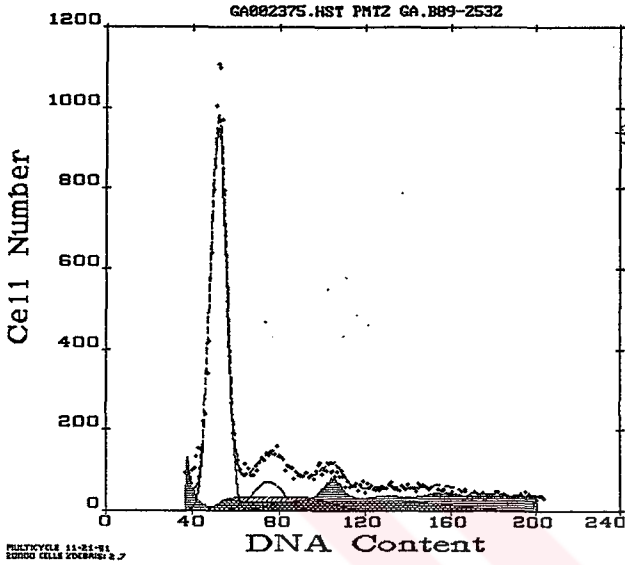
FCM incelemesi ile 5 vaka anoploid, 5 vaka diploid bulundu. Diploid vakaların birinde tümör oranı az olup (%10) dokunun büyük kısmı nekroz olduğu için histogram kalitesi kötüydü. DI ve % S bilgisayarda özel programlar ile belirlendi.

Tablo 3 vakaların ploidi, DI ve % S sonuçlarını özetlemektedir. (Bkz. diagram 4)

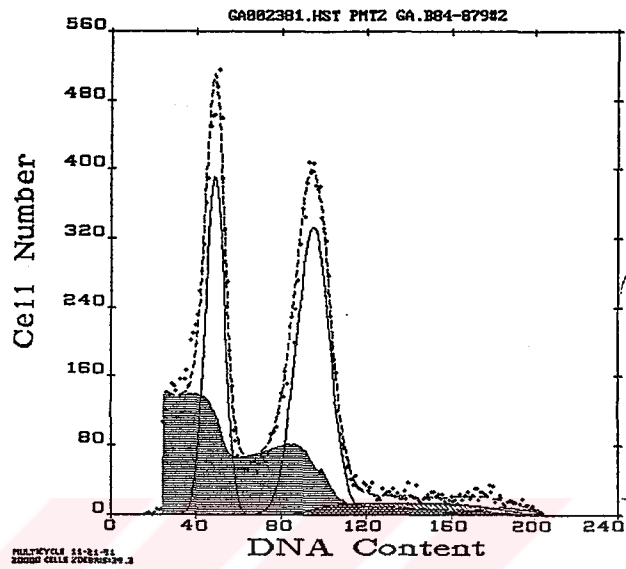
TABLO 3

Hasta No	Ploidi	DI	% S
1. 84-879	Anaploid (hipertetraploid)	1.03	% 15
2. 86-1091	Anaploid	1.7	% 36
3. 88-2324	Anaploid (hipertetraploid)	2.7	% 13
4. 88-2270	Anaploid (hipertetraploid)	2.7	% 23
5. 89-2532	Anaploid	1.4	% 64
6. 87-3440	Diploid	---	% 04
7. 84-1047	Diploid	---	% 65
8. 85-107 *	Diploid (?)	---	% 41
9. 88-2174	Diploid	---	% 20
10. 87-2647*	Diploid (?)	---	% 18

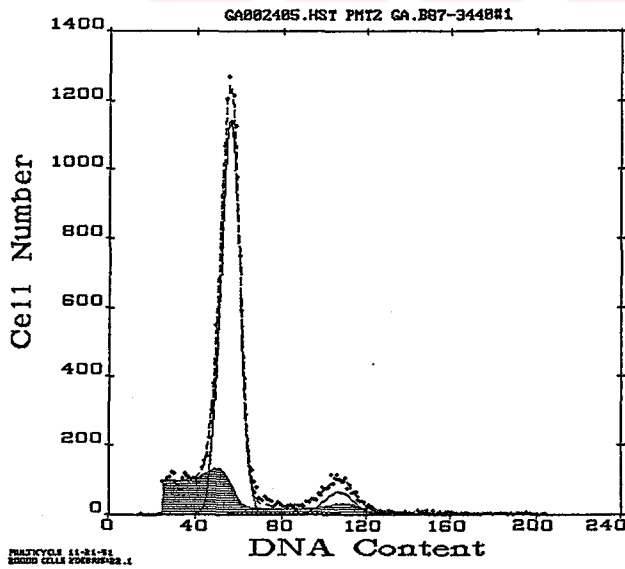
* Geniş G0 - G1 piki olması hipodiploid ya da diploide çok yakın bir anoploidiyi düşündürdü.



Grafik 1: Anaploid tümör
örneği DI: 1.4



Grafik 2: Tetraploid tümör örneği
DI: 1.9



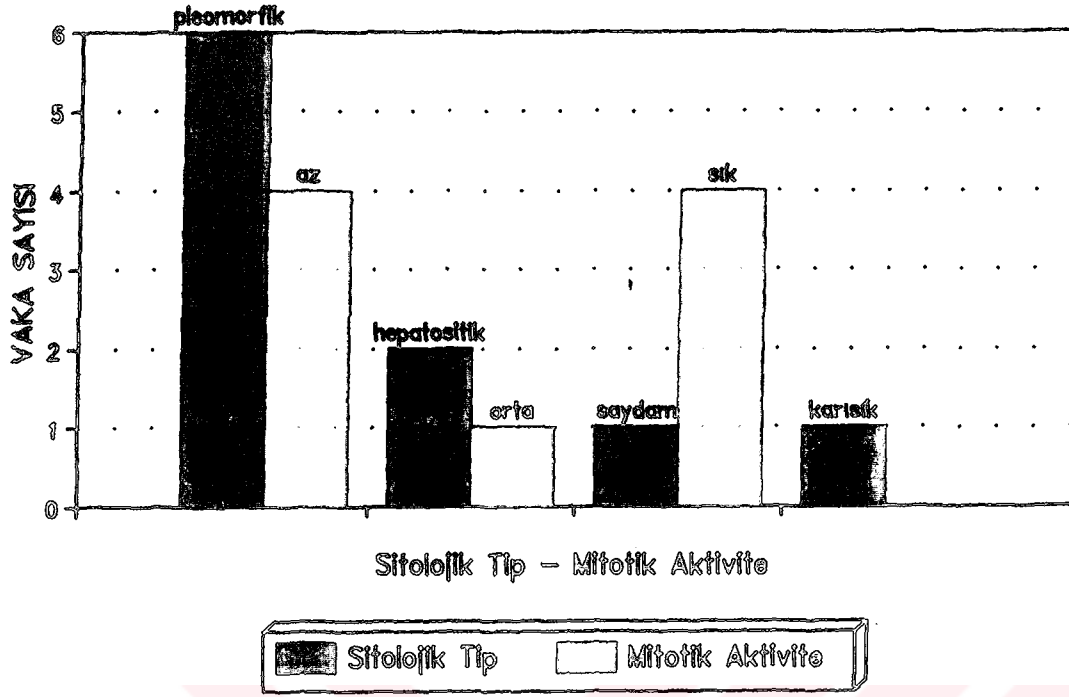
Grafik 3: Diploid
tümör örneği
DI: 1.0

TABLO 4

Hasta No	Mitoz	PCNA	Ploidi	DI	%S
1. 84-879	sık	+3	tetraploidi	1.93	%15
2. 86-1091	seyrek	+1	anaploidi	1.70	%36
3. 88-2324	sık	+3	hipertetraploidi	2.70	%13
4. 88-2270	sık	+3	hipertetraploidi	2.70	%23
5. 89-2532	sık	+4	anaploidi	1.40	%64
6. 87-3440	seyrek	boyanmadı	diploid	----	%04
7. 84-1047	seyrek	+2	diploid	----	%65
8. 85-107	orta	+1	diploid	----	%41
9. 88-2174	seyrek	0	diploid	----	%20
10. 87-2647	-----	+1	diploid	----	%18

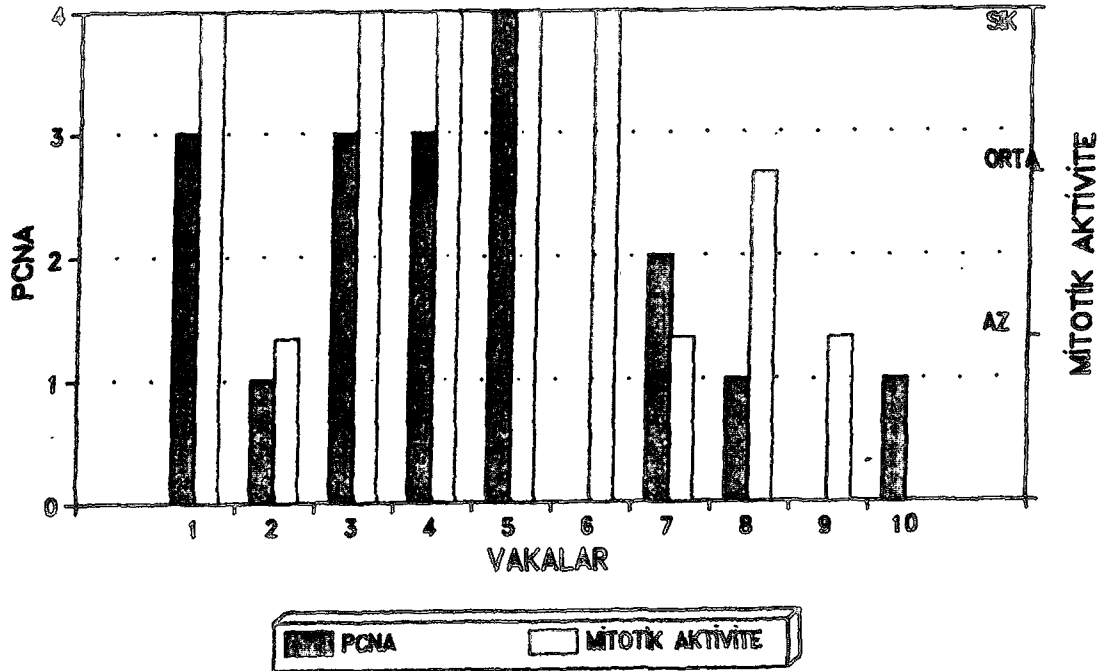
Tümörlerin proliferasyon kapasitelerini ortaya koymada kullanılan parametrelerin vakalardaki dağılımı Tablo 4'de özetlenmiştir. (Bkz. diagram 5)

VAKALARIN SİTOLOJİK TİP VE MİTOTİK AKTİVİTEYE GÖRE SAYISAL DÖKÜMÜ



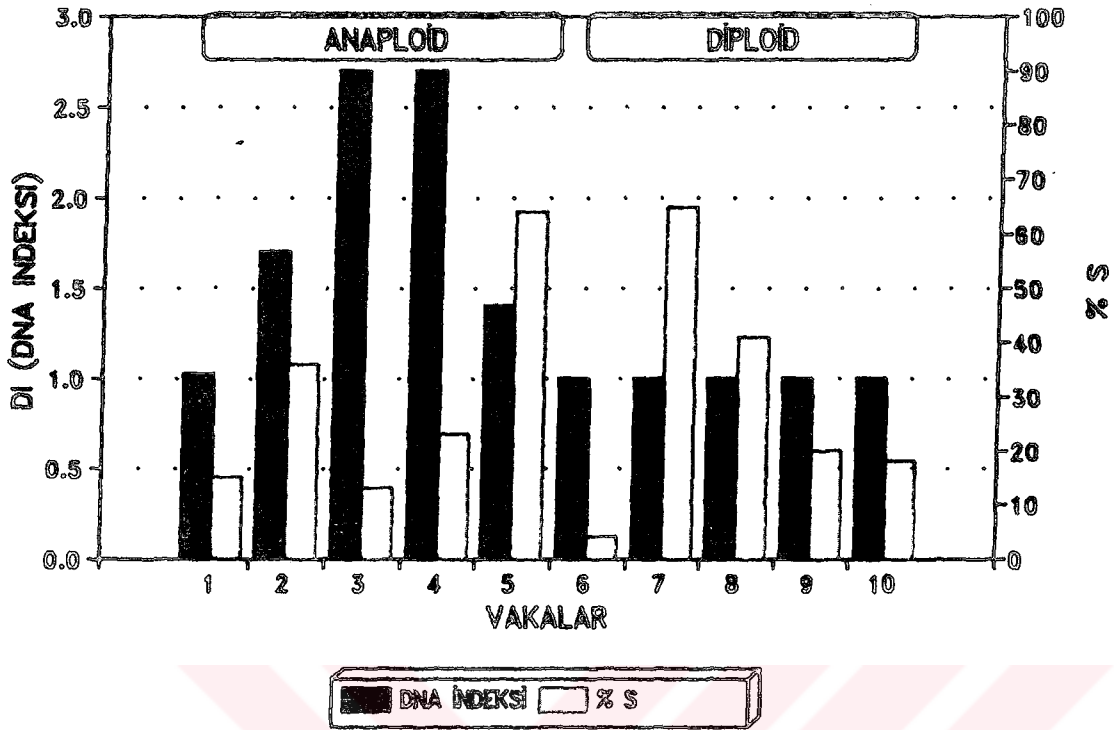
diag. 2

VAKALARIN PCNA SONUÇLARI VE MİTOTİK AKTİVİTELERİNİN DÖKÜMÜ



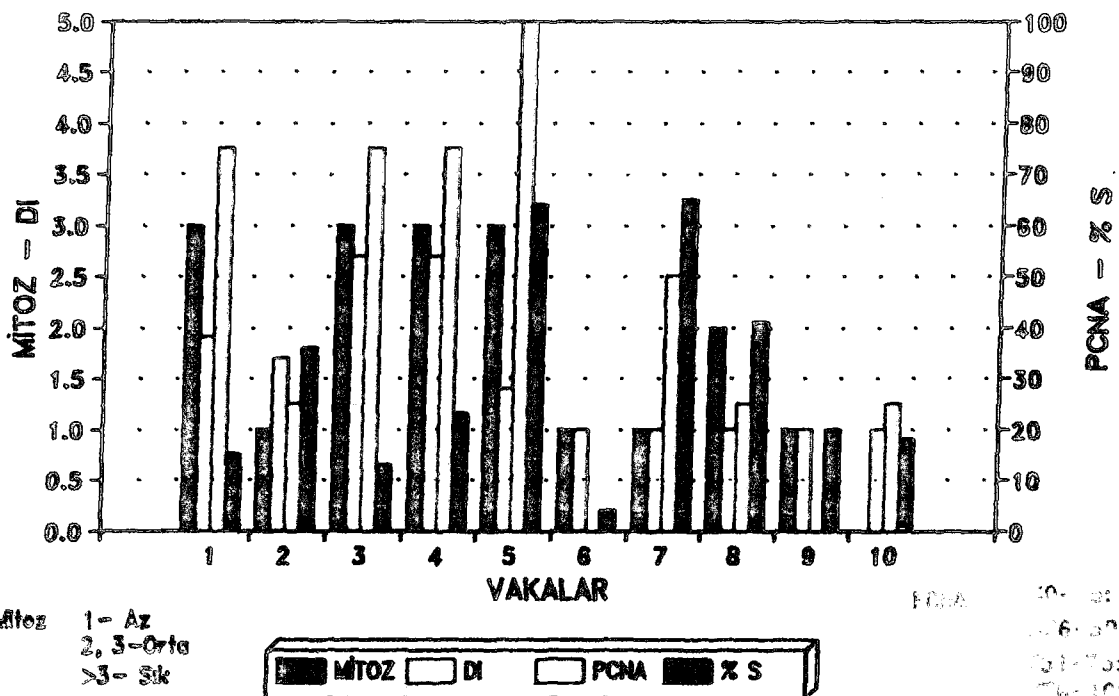
diag. 3

VAKALARIN FCM SONUÇLARINA GÖRE DOKUMU



diag 4

VAKALARIN KULLANILAN TÜM PARAMETRELERE GÖRE DOKUMU



Mitoz
1- Az
2, 3- Orta
>3- Çok

PCNA
10- 30: 1
36- 50:
51- 70: 3
71- 100: 2

diag 5

TARTIşMA VE SONUÇ

HSK'larda hiçbir parametrenin tümörün biyolojik davranışını ortaya koymada yeterli güvenilirlikte olmadığı bilinmektedir (15,16,17,18,20,21,22,23,24,40). Özellikle küçük HSK olarak guruplanan ve çapları 3 cm.yi geçmeyen tümörlerde beklenenden farklı klinik gidiş gözlenebilmesi tümör kinetiğinin etkili olabileceğini akla getirmektedir (22). Öteden beri tümörlerin histolojik düzeyde benzer görünümde olup, genotipik ve fenotipik farklılıklar gösterebildikleri bilinmektedir (25,26,27,28).

Bu çalışmada iki ayrı yöntemle HSK kinetiği araştırılmıştır. Vakaların yaş ve cinsiyet dağılımı özellikleri literatür ile uyum gösteriyordu. Tüm hastalarda bir ila yedi ay arasında değişen sürede nonspesifik sindirim yakınmaları öyküsü vardı. Bir vakada saptanan hepatit B yüzey antijeni pozitifliği dışında spesifik etyolojiye yönelik ipucu saptanmadı.

Histolojik olarak 6 vaka (%60) pleomorfik tipte olup, mitotik aktivitenin en fazla olduğu 4 vaka bunlar arasındaydı. İki vakada hepatositik tipte (%20), bir vakada tamamen şeffaf hücrelerden oluşan, "ksantoma benzeri" olarak nitelenen tipte (%10), bir vakada da (%10) hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı hücrelerle, şeffaf hücrelerden oluşan karışık tipte görünüm vardı. Pleomorfik olan tümörlerin az ayrılmış olduğu, diğerlerinin ise orta ve iyi derecede ayrılma gösterdiği saptanmıştır.

Mitotik aktivite tümörün proliferasyon kapasitesini

belirleme kriterlerinden biridir. Karaciğer çekirdek pleomorfizmi göstermesi açısından oldukça özel bir organdır. Sadece neoplastik olaylarda değil, rejenerasyona neden olabilecek pek çok patolojide de koyu boyanma, nükleusun irileşmesi, çift nükleus, mitoz görülebilen bulgulardır. Yaşlanma ile birlikte çift nükleuslu hücrelerin arttığı bilinmektedir (41,42). Nükleusun büyümesi her zaman bir kromozomal anomali ve DNA içeriği artışı anlamına gelmeyip, RNA ve diğer bazı proteinlerin artışı sonucu da görülebilir (43). Yapılan çalışmalarda özellikle akut hepatit gibi dinamik bir patolojide bile kliniğin ciddiyeti ile ışık mikroskopundaki nükleer değişiklikler uyumlu bulunmamıştır (43).

Karaciğerin kendisine özgü dinamisinin getirdiği sakıncalar yanısıra mitoz; kesitlerin kalınlığı, biyopsi materyalinin büyüklüğü, eksizyondan fiksasyona kadar geçen süre ile etkilenebildiği için özenle incelenmesi gereken bir aktivitedir (1,25,28).

Bu çalışmada da hücre ve nükleus pleomorfizmi ile mitoz her vakada aynı yoğunlukta saptanmamıştır.

Çoğalmakta olan hücrelerin nükleuslarında üretilen proliferasyon belirleyicisi proteinlerin antijenik özelliklerinden yararlanılarak immünohistokimya yöntemi ile tümör kinetiği hakkında bilgi edinmek olanağı vardır (44). Bu amaçla kullanılan PCNA, eski adı ile siklin moleküler ağırlığı 36 kD olan intranükleer bir polipeptid antijen olup, hücrede yapımı proliferasyon ve DNA sentezi ile direkt

ilişkilidir (26,29,45,46,47,48,49,50,51). Yakın zaman önce PCNA'nın DNA polimeraz delta aktivitesinde rol aldığı ve DNA replikasyon alanında lokalize olduğu saptanmıştır (26,29,48,50). PCNA, DNA sentezi başlamadan hemen önce G1 fazının geç döneminde artmaya başlar, S (sentez) fazında en yüksek düzeye ulaşır ve G2 ile M (mitoz) dönemlerinde ise dereceli olarak azalır. G0 ve G1 erken dönemlerinde en düşük seviyededir (26,29,30,51,52,53). PCNA ile G0 dinlenme fazındaki normal hepatositler, böbrek tübül hücreleri, glomerül hücrelerinde boyanma saptanmamış, ancak bu hücrelerin aktif üreyen kültürlerinde boyanma gözlenmiştir (29). Uyarılmamış hepatositlerde boyanma % 5 lerden az iken, uyarıldıklarında G1 fazındaki hepatositler G1-S sınırına getirildiğinde boyanmanın % 60 lara çıktığı gösterilmiştir (52). Benzer şekilde normal periferik lenfositlerde saptanabilir düzeyin altında iken, blastik hücrelerde yüksek seviyede bulunmasından yararlanılarak kronik lösemili hastalarda blastik krizin; sistemik lupus eritamatozuslu hastalarda hastalığın aktivitesinin izleminde kullanılmaktadır (29,51,54). PCNA ile boyanan doku elamanları: lenf nodülleri ve dalağın germinal merkezleri, timus kortikal alanı, testiste spermatogonia, barsak epitel hücreleri, derinin bazal tabaka hücreleri gibi sürekli çoğalma eyleminde olan yapılardır (29). Benign lezyonlarda yapılan çalışmada da hiperplazik değişikliklerde belirgin boyanma artışı gözlenmiştir (29).

Aynı amaçla kullanılan Ki-67'nin PCNA'dan farklı henüz

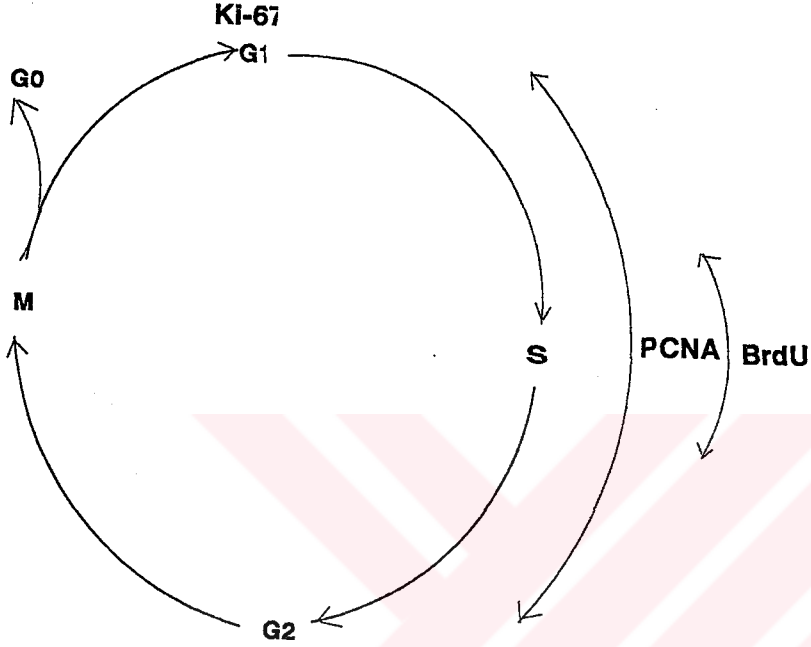
tanımlanmamış bir antijeni hedeflediği düşünülmektedir (25,26,27,29,55). Bu antijenin dinlenme fazı olan G0 daki hücreler dışında tüm siklus boyunca, G1 - S - G2 - M fazlarında pozitif olduğu saptanmıştır (25,26,27,55). Benzer şekilde tonsil, timus, mide, kolonda, proliferatif aktivite gösteren kompartmanlarda belirgin boyanma gözlenmiştir (25,56,57). Hiç bir uyarının verilmediği böbrek, beyin, karaciğer dokularında ise boyanma saptanamamıştır.

Bromodeoksiüridin (Brd-U) yöntemi 1982 yılından beri S-fazı hücrelerini boyamada kullanılan bir yöntemdir(25,58,59). Brd-U, S-fazı hücreleri oranı hakkında net bilgi veren tek antikordur (25,27,58). Boyama cerrahi girişim sırasında yada öncesinde başlar. Hastaya 150-200 mg/m²'den Brd-U verildikten sonra biyopsi alınır. Kesitler anti-Brd-U monoklonal antikorla boyanarak nükleuslar incelenir.

Her üç antikorda (PCNA, Ki-67, Brd-U) tümörlerin proliferasyon kapasitelerini araştırmada güvenilir olmakla birlikte kullanımları ve boyama dağılımları açısından farklılıklar gösterirler. Her üç antikorun boyadıkları hücre siklus poülasyonları farklı olup şekil 2'de özetlenmiştir (27). Ki-67 ile sadece taze dondurulmuş kesitlerde boyama yapılabildiği için, bu çalışmada kullanılmadı. Brd-U ve PCNA parafine gömülü dokularda kullanılabilir. Ancak Brd-U biyopsi öncesi işlemi gerektirdiğinden arşiv çalışmalarına uygun değildir.

Kullanılan anti-PCNA monoklonal bir antikor olup, spesifitesi yüksektir. Boyamada kullandığımız üç aşamalı

"avidin-biyotin-kompleks" yöntemi diğerlerine oranla 8-40 defa kuvvetli boyanma sağlayan bir yöntemdir (25). Böylece dokudaki zayıf bir reaksiyon bile amplifiye edilerek görüntülenmiştir.



Şekil 2

Çalışmamızda mitotik aktivitesi yüksek tümörlerden birinde +4, üçünde de +3 derecesinde boyanma saptanmıştır. Bunlar arasındaki boyanma farklılığını açıklayacak hiçbir klinik özellik dikkati çekmemiştir. Histopatolojik incelemede +3 boyananlarda belirgin nekroz alanları var iken, +4 boyanan tümörde nekroz alanının en az olduğu gözlenmiştir. Nekroz S fazı hücrelerinin yakalanmasını hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın güçleştirir (26). Ayrıca tümörlerde nekroz dışında bazı mekanizmalarla "çoğalma havuzundan" hücre kaybı olabilir (28). Kanser hücreleri normalden daha az kohezivdirler. Sürekli kayba uğrarlar. İleri ayrışma yoluna yada G0 dinlenme fazına girebilirler. Bu faktörler

yanısıra kısmen antijenik özellik kaybına yol açabilecek formalin tespiti ve parafine gömülme işlemleri de etkili olabilir.

Orta derecede mitotik aktivite gösteren vaka histopatolojik olarak diğer pleomorfik tümörlerden fazla bir farklılık göstermemekle birlikte PCNA ile +1 derecesinde boyanmıştı. Buna karşılık mitotik aktiviteleri seyrek olan tümörlerden biri +1, diğeri +2 derecesinde boyanırken mitozun hiç gözlenmediği tümörde +1 derecesinde boyanma saptandı. Bu bulgular mitotik aktivite bakımından benzer olan tümörlerin PCNA içeriği bakımından farklılık gösterebileceklerini ortaya koymuştur. Yüksek mitotik aktivite ve anaplastik hücre değişiklikleri içeren bir tümörde PCNA ile boyanmanın fazla olması mantıklı gözüksede her zaman beklenen sonuç izlenmez (29).

PCNA ile hiç boyanma olmayan biyopsilerden biri "Ksantoma benzeri" olarak nitelenen ve büyük kısmı şeffaf hücrelerden oluşan varyanttı. Literatürde de bu tümörün genelde daha iyi prognoz gösterdiği ve daha yavaş büyüdüğüne ilişkin bilgiler vardır (2). Seyrek mitoz içeren tümörlerden birinde ise yapılan denemelerin hiçbirisinde dokunun boyanması sağlanamadı. Bunda olasılıkla immünohistokimya öncesi dokunun uğradığı hasarın yanısıra, buna bağlı değişiklikleri ortadan kaldırmak için kullandığımız proteolitik sindirim yöntemlerinin etkili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan boyamalarda bazı tümörlere komşu sirotik yada hepatitik alanların hiçbirinde PCNA ile boyanma olmaması

Özellikle bu tümörlerdeki +1 boyanmanın spesifik olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu, literatürde de sözü edilen dinlenme fazındaki,(G0-G1) hepatositlerde boyanma olmaması ve sadece transforme yada tümör hücrelerinde yüksek olması ile uyumludur (27,29,30,45,47,52). Esas olarak PCNA siklusun G1 fazının sonunda artmaya başlayıp sentez-S fazında en yüksek düzeye ulaşır. PCNA'nın artmış olması normal büyüme kontrolünün kaybolduğunun göstergesidir. DNA replikasyonu çok aşamalı bir süreç olup PCNA bu eylemin sadece bir bölümünde görevlidir, kromozomların replikasyonu tamamlanması ile birlikte düşmeye başlar (45,47,48,49,50). PCNA DNA replikasyonunun tüm aşamalarında var olmakla birlikte özellikle elongasyon evresinde görev yaptığından S-fazı dışında saptanabilir düzeyin altındadır. Nitekim S fazı sonrası hemen düşmeye başlar, G2 ve M fazlarında en düşük seviyeye ulaşır. Kesitlerde mitotik hücrelerde minimal sitoplazmik boyanma olasılıkla replikasyonda PCNA dışında görevli protein-enzimlere bağlıdır (47,50). Mitotik hücrelerde spesifik boyanma olmaması PCNA'nın daha önceki aşamalarda, çoğalmaya hazırlanan hücreler hakkında bilgi verdiğini destekler niteliktedir.

FCM klinik olarak çok amaçlı kullanılmaktadır (31,32,33,34,60,61,62,63). Özellikle malignitesine morfolojik olarak kesin karar verilemeyen tümörlerde; sınırdaki (borderline) lezyonların alt sınıflamalarının yapılmasında; tümörün evresi ve histolojik ayrışma derecesinden bağımsız olarak prognozun belirlenmesinde;

tedaviye yanıtın izlenmesinde yararlıdır.

DNA içeriği ile tümör biyolojik davranışına ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır (31,34,35,38,39). Kolon, prostat, mesane, akciğer, over, meme, endometrium gibi dokuların primer tümörleri için anaploidi kötü prognoz belirleyicisi iken nöroblastom, akut lenfoblastik lösemi gibi bazı çocukluk çağı tümörleri için de iyi prognozu belirler. DNA içeriğinin saptanması dışında hücre siklus analizi ile ek bilgiler edinilmesi morfolojik ve evre olarak benzer olan tümörlerde biyolojik davranış farklılıklarını anlamada yardımcıdır. Örneğin lenf nodüllerinde tutulumu olmayan bir meme karsinomunda diploid DNA içeriği iyi prognoz belirtisi iken aynı tümörde yüksek S fazı hücre oranı olması prognozu olumsuz yönde etkiler (35,38,39).

HSK'larda DNA içeriği ve siklus analizinin prognozla ilişkisini araştıran bazı çalışmalar vardır (20,21,22,23,24). Anaploidi gösteren tümörlerin daha büyük boyutta oldukları, intrahepatik yayılım gösterdikleri ve hastaların yaşam süresinin daha kısa olduğu saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda 5 tümörde anaploidi (%50), 5 tümörde (%50) diploidi saptandı. Vakaların histolojik tiplerine göre belirli bir ploidi karakteristiği göstermemeleri literatür ile uyumludur (20,23,64,65,66). Anaploid tümörlerden biri dışında (hepatositik/trabeküler) hepsinde mitotik aktivite ve PCNA boyanma derecesi yüksekti. Bu durumda bu üç parametrenin birbirleri ile uyumlu oldukları sonucuna varıldı.

Ploidiyi kantitatif olarak değerlendirmede DNA indeksi kullanıldı. Çalışmamızdaki anaploid tümörlerden ikisinde DI 1.9 un altında, üçünde ise 1.9 un üzerinde bulundu. Bu üç tümörden biri tetraploid, diğerleri hipertetraploid idi. Bulgumuz HSKlarda tetraploidi ve hipertetraploidinin diğer tümörlerden daha sık görüldüğüne ilişkin bilgilerle uyumludur (20,24). Bu durum olasılıkla karaciğerin kendisine özgü dinamisinden kaynaklanmaktadır.

Karaciğer gibi yavaş proliferen olan parankimatöz organlarda sentezlenen tüm DNA, hücre bölünmesinde kullanılmaz ve birikerek poliploidiye neden olabilir. Sonuçta DNA bir çoğalmaya, birde birikime yönelik artar (67). Özellikle birikime yönelik olanı artmış metabolik aktivite, protein sentezine bağlıdır. Bu durumda hücreler G0 fazından hareket ederek DNA içeriklerini arttıırırlar. Genellikle normal karaciğerde popülasyonun yaklaşık %10.2'sini proliferatif hücreler oluşturur (67,68). G2 fazındaki hücreler henüz bölünmemiş ve tetraploid hücrelerdir ki, karaciğerde dinlenme fazında bile fonksiyonel nedenlerle yüksektir (67,68,69). Ancak normal karaciğerdeki metabolik gereksinime bağlı oluşan gen amplifikasyonu geri dönebilir bir olay olup, gereksinim ortadan kalktığında hücre fazla DNA içeriğinden kurtulur (69). Bu nedenle tetra ve hipertetraploidi normal karaciğerde de saptanabilir.

Yüksek DI gösteren HSK'ların düşük DI içerenlere oranla daha iyi prognoz gösterdiklerine dair gözlemler vardır (20). Bunun nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte yüksek DI

olanlarda G2 faz hücrelerinin daha fazla olabileceği ve bunların da daha çok birikimci amaçla DNA içerdikleri varsayımlardan biridir (20). DI heterojenitesi aynı zamanda hücre klonal heterojenitesini de vurgular ki, bu tedavinin yönlendirilmesi açısından çok önemlidir (64,65,66,70).

DI'leri 1.9 un üstünde olan tümörler mitotik aktivite, PCNA boyanma derecesi açılarından benzerlik gösterdiler. DI 1.9 un altında olan iki tümörden birinde sık mitoz, (+)4 PCNA boyanması, diğesinde seyrek mitoz, (+)1 PCNA saptanması bu parametreler arasındaki ilişkide şüphe uyandırıyordu. Parametreleri uyumsuz bulunan tümörde anaploidiye tümörün kendisinden çok çevre karaciğer dokusundaki yoğun inflamatuvar hücrelerin neden olduğu düşünülmüştür. Diğer anaploid tümörlerin hiçbirinde çevre doku yoktur. Zaten FCM'nin zayıf noktası tümöral ve nontümöral hücrelerin ayrımını yapamamasıdır (31,70,71). Bu nedenle FCM ile çalışılacak materyal mutlaka önceden histopatolojik olarak tanımlanmalıdır.

DI'nin diğerlerine göre daha düşük olmasına rağmen +4 PCNA boyanması gösteren tümörde nekrozun çok az oranda olması etken olan faktörlerden biridir. Ayrıca PCNA'nın esas olarak G1 sonu-S fazı hücrelerini boyadığı ve S fazı yüksek olan tümörlerin de G2 hücreleri yüksek olan tümörlere oranla daha düşük DI vereceği göz önüne alınırsa her iki parametrenin de aynı anlamda bilgi verdikleri görülmüştür. Bu durum DI'si düşük anaploid tümörlerin, tetra ve hipertetraploid HSK'lara oranla daha çabuk büyüüp yayılım göstermelerine açıklık

getirmektedir.

Diploid tümörlerde DI'in neden olabileceği bir heterojenite yoktur. Bizim vakalarımız arasında iki diploid tümör histogramında geniş G0-G1 piki varlığı saklı bir hipodiploidi yada diploidiye yakın bir anaploidiyi düşündürmüştür.

Tümörlerdeki kromozomal anomaliler DNA içeriğindeki anormalliklerle belli olur. Ancak bunun saptanabilmesi için iki hücre popülasyonu arasındaki DNA içeriğinde en az %4'lük bir fark olmalıdır (31,33). Dengeli translokasyon yada kısa kolda bir defekt gibi küçük değişiklikler FCM ile saptanamıyabilir (33,64). Nitekim sitogenetik inceleme ile karşılaştırmalı bir çalışmada diploid olarak saptanan tümörlerden bir kısmının hipodiploid oldukları gözlenmiştir (72). HSK'larda diploidi saptanan bazı tümörlerde beklenenden daha kötü prognoz görülmesi de bu faktöre bağlanmıştır (20).

Çalışmamızda diploid tümörlerin dördünde mitoz seyrek, birinde orta sıklıktaydı. Seyrek mitozu olanlardan birinde PCNA +2 derecesinde boyanma gösteriyordu. Şüpheli diploidi olan vakalar ise +1 PCNA boyanması gösteriyorlardı ancak mitotik aktiviteleri farklıydı. Diploid tümörlerde DI farklılığı saptanmadığından diğer parametrelerle ilişkilendirilemedi. Ancak diploid tümörlerin de PCNA boyanması bakımından heterojen oldukları saptandı.

Diploid DNA içeriği olan tümörlerden bir diğeri ksantoma benzeri, hemen tamamen şeffaf hücrelerden oluşan, çevre

dokuda aktif hepatitik değişiklikler gösteren tümördür. Hepatit aktivitesi ile DNA içeriği arasında doğru orantılı bir ilişki saptanamamıştır (73). Sirotik çevre dokunun tümör dokusundan daha fazla olduğu materyalde de diploidi saptanması hepatit-siroz-HSK gelişiminde DNA ploidisinin her zaman net bir ilişkiyi ortaya koyacak kronolojik sıralamayı izlemediğine ilişkin görüşlerle uyumludur (73).

FCM ile ploidi, DI yanı sıra hücre siklus analizi ile S fazı hücre oranı da saptanabilir (32,35,61,62,63). Tedaviye esas duyarlı olan popölasyon S ve G2M fazı hücreleridir. S fazını net olarak belirlemek teknik bakımdan S+G2 - M fazlarından oluşan "proliferatif indeksi" (PI) belirlemekten daha güçtür (31,70). Çünkü hem G0/G1 hem de G2M fazları ile arasındaki sınırları kesin olarak koymak her zaman olanaklı değildir. Ancak yine de S fazı oranının prognostik açıdan hem DI hem de PI'dan daha anlamlı olduğu düşünülmektedir (66,70,74,75,76,77).

Bu çalışmada anaploid tümörlerin hepsinde S-fazı oranı yüksek bulunmuştur. S fazı yüzdesi en yüksek olan tümörün DI 1.4'tü. Histolojik olarak mitotik aktivitesi yüksekti. Histolojik özellikleri benzer olan anaploid diğer üç tümörün S faz oranları daha düşük bulundu. Bu tümörlerin DI'ı 1.9 un üzerindeydi. DI'ı yüksek olan HSKların daha iyi prognoz gösterdiği gözönüne alınırsa böyle vakalarda S faz hücre oranının daha düşük olması anlamlıdır. Anaploid olup mitotik aktivitesi ve PCNA içeriği düşük olan tümörde S fazı oranı yüksekliği diploid tümörlerdeki gibi çevre doku varlığı ile

açıklandı. S fazı yüksek olmayan diploid vakada ise çevrede yoğun fibröz bantlar vardı.

Bu çalışmada HSK'un proliferatif kapasitesi, mitotik aktivite, PCNA boyanılabilirliği DNA içeriği, DI ve S fazı hücre oranları ile değerlendirilmiştir.

Hiçbir parametrenin tümörün histolojik yapısı ile doğru orantılı olmadığı saptanmıştır. Mitotik aktivite saptanması en çabuk ve zahmetsiz parametre olmakla birlikte proliferatif popülasyonla ilgili oldukça kaba sonuçlar vermektedir. Bunu daha incelikli yöntemlerde benzer aktivite gösteren tümörlerde farklı sonuçlar alınabilmesi ile görmekteyiz.

PCNA sık mitoz gösteren tümörlerin aslında proliferasyon kapasiteleri bakımından farklı olabileceklerini ortaya koymuştur. Hiç mitotik aktivite gözlenmemiş bir tümörde PCNA ile boyanma olması mitozun yetersizliğine bir başka örnektir.

Ploidi karaciğerde DI olmaksızın fazla bir anlam taşımamaktadır. Tümörlerin DNA indeksleri ve PCNA içerikleri açılarından da paralel sonuçlar verdikleri gözlenmiştir.

Literatürde prognoz ve proliferasyon kapasitesi bakımından en anlamlı parametre olarak bilinen S fazı hücre oranının bizim çalışmamızda da anlamlı sonuçlar verdiğini gözledik. Özellikle PCNA boyanma derecesi ile S fazı hücre oranının paralel olduğunu saptadık. Örneğin sık mitoz gösteren anaploid iki tümörde esas farklılığın S fazı hücre oranı olduğu ve buna en yakın bilgiyi PCNA'nın farklı derecelerde boyanarak verdiğini gözledik.

HSK gibi biyolojik davranışı saptanması güç tümörlerde kinetik özelliği belirlemede PCNA ile boyama, DI ve S fazı hücre oranının yardımcı olabileceği sonucuna vardık. Kuşkusuz detaylı hücre siklus analizini vermesi, tek bir hücreye ait değişikliği bile saptayabilmesi bakımlarından FCM üstün bir yöntemdir. Ancak teknik olarak komplike ve pahalıdır. Buna karşılık immünohistokimya daha pratik, ucuz bir yöntem olup doku bütünlüğünü bozmaması, histopatolojik değerlendirmeye olanak sağlaması bakımlarından daha avantajlıdır. Nitekim çevre doku varlığına bağlı yüksek S fazı oranı ve anaploidi gösterbilen bir tümörde PCNA ile +1 düzeyinde ve sadece tümörde boyanma gözlenmiştir.

Literatürde HSKlarda FCM ve Brd-U ile yapılmış çalışmalar vardır (20,21,22,23,24,58). Ancak PCNA karaciğer tümörlerinde daha önce kullanılmamıştır. S fazı oranını değerlendirmede PCNA'nın FCM ile benzer sonuçlar verdiği bir başka çalışmada da vurgulanmıştır (26,27).

Sonuç olarak biz de hepatosellüler karsinomlarda PCNA kullanılarak proliferasyon kapasitesi hakkında bilgi edinilebileceği sonucuna vardık. Bu ön çalışma ışığında daha geniş bir seride klinik izlemi de içerecek bir çalışmanın HSKların biyolojik davranışlarını aydınlatmada ve tedavilerini yönlendirmede yararlı olacağı ortaya konmuştur.

ÖZET

Bu çalışmada 1984 - 1990 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'na gönderilmiş 10 HSK biyopsi materyalinde kinetik inceleme yapılmıştır.

Bu vakaların histolojik özelliklerine göre dökümü yapılmıştır. Proliferasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla her vakada mitotik aktivite belirlenmiştir. İmmünohistokimya yöntemi ile bir proliferasyon belirleyicisi olan anti-PCNA ile boyama yapılmıştır. Flovositometri (FCM) ile DNA içerikleri, DI ve S fazı hücre oranı belirlenmiştir.

Sonuç olarak histolojik tiplendirme ile proliferasyonu belirleyen parametreler arasında bir ilişki kurulamamıştır. Mitotik aktivite değerlendirilmesi en kolay parametre olmakla birlikte diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça yetersiz kalmıştır. FCM ile saptanan anaploid tümörlerin homojen bir grup olmadığı ve DI ile S fazı hücre oranları bakımından heterojenite gösterdikleri dikkati çekmiştir. PCNA ile boyama sonuçları DI ve S fazı hücre oranları ile paralellik göstermiştir.

Bu durumda PCNA ile boyamanın FCMye göre daha pratik, kısa süren ve ucuz bir yöntem olarak HSKların proliferasyon kapasitelerinin değerlendirilmesinde aynı derecede güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

INVESTIGATION OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA KINETICS BY COMPARING HISTOPATHOLOGICAL, IMMUNHISTOCHEMICAL AND FLOWCYTOMETRIC METHODS

Kinetical studies of proliferation capacities of ten different hepatocellular carcinoma (HCC) cases, in between the years 1984-1990, from the archives of Gazi University Pathology Dept. were done. Histologic spesifications of these cases were studied. Mitotic activity in each case was found in order to see the proliferation capacity. Immunohistochemically Anti-PCNA staining as a proliferation marker was applied. DNA content, DI and ratio of S-phase cells were calculated by Flowcytometry (FCM).

No significant relation between histologic typing and proliferation parameters were found as a conclusion. Though the calculation of mitotic activity is the most simple parameter, it is found to be unsatisfactory comparing with the other methods. The anaploidy calculated by FCM showed that the group was not homogeneous and showed heterogeneity in terms of DI and S-phase cell ratio. Results of PCNA staining showed parallelism with DI and S-phase cell ratio results.

It can be concluded that PCNA staining, compared to FCM, is more practical, cost effective and less time consuming, yet as reliable in studying the proliferation capacities of HCC.

KAYNAKLAR

1. Juan R.: Liver, Ackerman's surgical pathology, The C.V. Mosby Co. 1989; vol 1:706-714.
2. MacSween R.N.M., Anthony P.P., Scheuer P.J.: Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract, Pathology of the liver, Churchill Livingstone. 1988: 574-646.
3. Chopra S., May R.J.: Neoplasms of the liver, Pathophysiology of GIS disease, Little Brown Co. 1989: 463-488.
4. Gerber M.A.: Recent studies on the developing human hepatocellular carcinoma, Cancer Surveys 1986: 5(4): 741-755.
5. Bisceglie A.M.: Hepatocellular Carcinoma: Molecular biology of its growth and relationship to hepatitis B virus infection, Med.Clin.North Am. 1989: 73(4): 985-997.
6. Chisari F.V., Klopchin K., Moriyama T., Pasquinelli C., Dunsford C.A.: Molecular Pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice, Cell 1989: 59: 1145-1156.
7. Tao L.C.: Oral contraceptive associated liver cell adenoma and hepatocellular carcinoma, Cancer 1991: 68: 341-347.
8. Govindarajan S., Conrad A., Lim B., Valinluck B., Kim A. M.: Study of preneoplastic changes of liver cells by immunohistochemical and hybridization techniques, Arch

Pathol Lab Med 1990: 114: 1042-1045.

9. Okuda K., Peters R.L., Simson I.W.: Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas, proposal of new classification, Cancer 1984: 54: 2165-2173.
10. Kemeny F., Vadrot J., Wu A., Smadja C., Meakins J.L.: Morphological and histological features of resected hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients in the West, Hepatol. 1989: 9(2): 253-257.
11. Loda M., Mendosa A.E., O'Hara C., Crawford J.M., Federman M.: Well differentiated hepatocellular carcinoma associated with long-term survival, Virchows Arch. A. Pathol. Anat. 1991: 418: 551-556.
12. Gibson J.B., Sobin L.H.: Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas - WHO 1978: 20.
13. Edmondson H.A., Steiner P.E.: Primary carcinoma of the liver, Cancer 1953: 7: 462-490.
14. The Liver Cancer Study Group of Japan: Primary liver cancer in Japan, Cancer 1984: 54: 1747-1755.
15. Chlebowski R.T., Tong M., Weissman J., Block J.B., Ramming K.P.: Hepatocellular Carcinoma, Diagnostic and prognostic features in North American patients, Cancer 1984: 53: 2701-2706.
16. Attali P., Prodhomme S., Pellettier G., Papos L., Ink O.: Prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma, Cancer 1987: 59: 2108-2111.
17. Okuda K., Ohtsuki T., Obata H., Tomimatsu M., Okasaki

- N.: Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment, *Cancer* 1985: 56: 918-928.
18. Zhou X., Tang ZY., Yu Y.Q., Yang B.H., Lin Z.Y.: Long-term survivors after resection for primary liver cancer, *Cancer* 1989: 63: 2201-2206.
 19. Grigioni W.F., Garbisa S., D'Errico A., Baccarini P.: Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens, *Am. J. Pathol.* 1991: 138(3): 647-654.
 20. Fujimoto J., Okamoto E., Yamanaka N., Toyosaka A., Mitsunobu M.: Flowcytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma, *Cancer* 1991: 67: 939-944.
 21. Ishizu H.: Flowcytometric analysis of the nuclear DNA content of hepatocellular carcinoma, *Japn. J. Surg.* 1989: 19(6): 662-673.
 22. Wenming C., Mengchao W.: The biopathologic characteristics of DNA content of hepatocellular carcinoma, *Cancer* 1990: 66: 498-501.
 23. Ezaki T., Kanematsu T., Okamura T., Sonoda T., Sugimachi K.: DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications, *Cancer* 1988: 61: 106-109.
 24. Kuo S.H., Sheu J.C., Chen D.S., Sung J.L., Lin C.C.: Cytophotometric measurements of nuclear DNA content in hepatocellular carcinomas, *Hepatol.* 1987: 7(2): 330-332.
 25. De Lellis R.A.: Proliferation markers for neoplasms of

- the nervous system, *Advances in immunohistochemistry*, Raven Press 1988: 301-312.
26. Garcia R.L., Coltrera M.D., Gown A.M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/ cyclin monoclonal antibodies in fixed embedded tissues, comparison with flowcytometric analysis, *Am.J.Pathol.* 1989: 134(4): 733-739.
27. Coltrera M.D., Gown A.M.: PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines, *J. Histochem. Cytochem.* 1991: 39(1): 23-30.
28. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L.: *Neoplasia, Pathologic Basis of Disease*, W.B. Saunders Co. 1989: 251-256.
29. Robbins B.A., Vega D., Ogata K., Tan E.M., Nakamura R.M.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987: 111: 841-845.
30. Galand P., Degraef C.: Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S-phase cells in paraffin sections from animal and human tissues, *Cell Tissue Kinet.* 1989: 383-392.
31. Koss L.G., Czerniak B., Herz F., Wersto R.P.: Flowcytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors, *Hum. Pathol.* 1989: 22: 528-548.
32. Barlogie B., Raber M.N., Schumann J., Johnson T.S., Drewinko B.: *Flowcytometry in clinical cancer research*,

- Cancer Res. 1983: 43: 3982-3997.
33. Valenzuela R., Hurtubise P.E.: Flowcytometry, Basic principles and clinical applications, A.S.C.P. National meeting 1992: 1-79.
 34. Coon J.S., Landay A.L., Weinstein R.S.: Biology of disease, advances in flowcytometry for diagnostic pathology, Lab. Invest 1987: 57(5): 453-479.
 35. Williams N.N., Daly J.M.: Flowcytometry and prognostic implications in patients with solid tumors, Surg. Gynecol. Obst. 1991: 171: 257-266.
 36. Hedley D.W., Friedlender M.L., Taylor I.D.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flowcytometry, J. Histochem. Cytochem. 1983: 31(11): 1333-1335.
 37. Schutte B., Reynders M.M.J., Bosman F.T., Blijham G.H.: Flowcytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin embedded tissue, Cytomet. 1985:6:26-30.
 38. Frankfurt O.S., Arbuck S.G., Chin L.J., Greco W.R., Pavelic Z.P.: Prognostic applications of DNA flowcytometry for human solid tumors, Ann. N.Y. Acad. Scie. 1986:468:276-290.
 39. Merkel D.E., Dressler L.G., McGuire W.L.: Flowcytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy, J. Clin. Oncol. 1987:5(1):1690-1703.
 40. Akashi Y., Koreeda C., Enomoto S., Mizuno T., Shiozaki Y.: Prognosis of unresectable carcinoma: An evaluation

- based on multivariate analysis of 90 cases, *Hepatol.* 1991:14:262-268.
41. Ranek L., Keiding N., Jensen S.T.: A morphometric study of normal human liver cell nuclei, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A* 1975:83:467-476.
 42. Watanabe I., Tanaka Y.: Age related alterations in the size of human hepatocytes, *Virchows Archiv. Cell Pathol. B* 1982:39:9-20.
 43. Ranek L., Jensen S. T., Keiding N.: Karyometry of liver biopsies in virus hepatitis, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A* 1975:83:477-486.
 44. Czerniak B., Herz F., Wersto R.P., Koss L.G.: Expression of Ha-ras oncogene p21 protein in relation to the cell cycle of cultered human tumor cells, *Am. J. Pathol* 1987:126:411-416.
 45. Bravo R., Frank R., Blundell P.A.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta, *Nature* 1987:326:515-517.
 46. Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein, *Nature* 1987:326:517-520.
 47. Prelich G., Kosturo M., Marshak D.R., Mathews M.B., Stillman B.: The cell cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in-vitro, *Nature* 1987:326:471-475.
 48. Mercer W.E., Shields M.T., Lin D., Appella E., Ullrich

- S.J.:Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating cell nuclear antigen expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991:88:1958-1962.
49. Jaskulski D., DeRiel J.K., Mercer W.E., Calabretta B.,Baserga R.: Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin, Science 1988:240:1544-1546.
50. Mathews M.B., Bernstein R.M., Franza B.R., Garrels J.I.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin, Nature 1984:309:374-376.
51. Kurki P., Vanderlaan M., Dolbeare F., Gray J., Tan E. M.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during cell cycle, Exp. Cell Res. 1986:166:209-219.
52. Ikeda T., Sawada N., Fujinaga K., Minase T., Mori M.: c-H-ras gene is expressed at the G1 phase in primary cultures of hepatocytes, Exp. Cell Res. 1989:185:292-296
53. Kallioniemi O.P., Blanca G., Alavaikko M.: Improving the prognostic value of DNA flowcytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction, Cancer 1988:62:2183-2190.
54. Murashima A., Takasaki Y., Ohgaki M., Hashimoto H., Shirai T.:Activated peripheral blood mononuclear cells detected by murine monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen in active lupus patients, J. Clin. Immunol. 1990:10(1): 28-37.

55. Wersto R.P., Herz F., Gallagher R.E., Koss L.G.: Cell cycle dependent reactivity with the monoclonal antibody Ki-67 during myeloid cell differentiation, Exp.Cell Res. 1988:179:79-88.
56. Franklin W.A., McDonald G.B., Stein H.O.: Immunohistologic demonstration of abnormal colonic crypt cell kinetics in ulcerative colitis, Hum. Pathol. 1985:16:1129-1132.
57. Erber W.N., Prinching A.J., Mason D.Y.: Immunohistochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears, Lancet 1984:1042-1045.
58. Tarao K., Shimizu A., Harada M., Ohkawa S., Okamoto N.: In-vitro uptake of bromodeoxyuridine by human hepatocellular carcinoma and its relation to histopathologic findings and biologic behavior, Cancer 1991:68:1789-1794.
59. Gratzner H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine, a new reagent for detection of DNA replication, Science 1982:218:474-475.
60. Laerum O.D., Farsund J.: Clinical application of flowcytometry; a review, Cytomet. 1981:2:1-9.
61. Clevenger C.V., Bauer K.D., Epstein A.L.: A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and DNA quantitation using monoclonal antibodies and flowcytometry, Cytomet. 1985:6:208-214.
62. Schutte B., Reynders M.M.J., Assche M.V.J., Hupperets

- P.S.G.I., Bosman F.T.: An improved method for the immunocytochemical detection of bromodeoxyuridine labeled nuclei using flowcytometry, Cytomet. 1987:8:372-376.
63. Czerniak B., Darzynkiewicz Z., Herz F., Koss L.G.: Cancer Res. 1984:44:4342-4346.
64. Hiddemann W., Bassewitz D.B., Kleinemeier H.J., Hauss J., Buchner T.: DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer, Cancer 1986:58:258-263.
65. Ljungberg B., Stenling R., Roos G.: DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity, Cancer 1985:56:503-508.
66. Volm M., Mattern J., Muller T., Drings P.: Flowcytometry of epidermoid lung carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival, Anti-cancer Res. 1988:8:105-112.
67. Arad D.S., Zajicek G., Bartfeld E.: The streaming liver IV: DNA content of the hepatocyte increases with its age, Liver 1989:9:93-99.
68. Schwarze P.E., Petterson E.O., Shoaib M.C., Seglen P.O.: Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis, Carcinogenesis 1984:5(10):1267-1275.
69. Zajicek G., Schwartz D.: Streaming liver VII: DNA turnover in acinus zone-3, Liver 1990:10:137-140.
70. Kallioniemi O.P.: Comparison of fresh and paraffin embedded tissue as starting material for Dna

flowcytometry and evaluation of intratumor heterogeneity, Cytomet. 1988:9:164-169.

71. Kute T.E., Galleshow G.J., Hopkins M., Buss D., Case D.: How reproducible are flowcytometry data from paraffin embedded blocks, Cytomet. 1988:9:494-498.
72. Remvikos Y., Seurreau M.G., Vielh P., Zafrani B., Magdelenat H.: Relevance of DNA ploidy as a measure of genetic deviation: A comparison of flowcytometry and cytogenetics in 25 cases of human breast cancer, Cytomet. 1988:9:612-618.
73. Lin H.H., Shyu W.C., Chen G.L., Lin Y.H.: DNA measurements in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, Liver 1990:10:313-318.
74. Hedley D., Rugg C.A., Gelber R.D.: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer, Cancer Res. 1987:47:4729-4735.
75. Nervi C.O., Badaracco G., Morelli M., Starace G.: Cytokinetic evaluation in human head and neck cancer by autoradiography and DNA cytofluorometry, Cancer 1980:45:452-459.
76. Terz J.J., Curtchef P., Lawrence W.: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors, Cancer 1971:28:1099-1110.
77. Strang P., Eklund G., Stendhal U., Frankendal B.: S-phase rate as a predictor of early recurrences in carcinoma of the uterine cervix, Anti-cancer Res.

1987:7:807-810.

