

Hepatosellüler karsinom kinetiğinin farklı yöntemlerle araştırılması

Investigation of hepatocellular carcinoma kinetics by different methods

Dr. Gülen Akyol¹, Dr. Ömer Uluoğlu¹, Dr. Ayşe Dursun¹, Dr. Flora Shoof², Dr. Michael Gerber²

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.¹, Ankara, Tulane University Medical School, Pathology Departmen², New Orleans

ÖZET: Hepatosellüler karsinom (HSK) gibi biyolojik davranışı saptanması güç tümörlerde kinetik özelliklerin belirlenmesinin yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada da 1984-1990 yılları arasında bölümümüze gönderilmiş 10 HSK materyalinde farklı yöntemler kullanılarak kinetik inceleme yapılmıştır. Öncelikle histolojik özellikler belirlenmiş ve daha sonra proliferasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla mitotik aktivite, immünohistokimyasal olarak anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ile boyanma oranı; flovisitometri ile de DNA içeriği (ploidi), DNA indeksi ve S fazı hücre oranı saptanmıştır. Mitotik aktivitenin proliferasyon kapasitesini belirlemede yetersiz olduğu belirlenmiş, PCNA ile alınan sonuçların ise DNA indeksi (DI) ve S fazı hücre oranları ile paralel oldukları düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Hepatosellüler karsinoma, PCNA, flovisitometri

GİRİŞ:

Hepatosellüler karsinom (HSK) oldukça kötü klinik seyir gösteren solid malign tümörlerdendir. Prognozunu belirlemek amacıyla yapılan tek ve çok parametrelili klinikopatolojik çalışmalarla tatmin edici bir sonuca ulaşılamamıştır.

Son yıllarda tümörlerin hücre popülasyonları ve kinetiklerinin bilinmesinin, büyüme hızları, yayılım kapasiteleri ve ilaçlara duyarlılıklarını belirlemede yardımcı olabildiği görülmüştür (1,2). Benzer çalışmalar HSK'lar için de yapılmaktadır (3-5).

GEREÇ VE YÖNTEM:

1984-1990 yılları arasında (Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji bölümünde HSK tanısı almış 10 adet biyopsi materyali tekrar incelendi. Materyallerin hepsi %10 luk formalinde tespit edilip parafine gömülmüş insizyonel biyopsi materyalleriydi. Hematoksilen-eozin (H-E) yanı sıra diastazli-diastazsız periyodik asid Schiff (PAS) ve Gomori retikülün boyaları uygulandı. Hücre nükleus ve sitoplazma özellikleri, tümörün patterni, differansiyasyon derecesi ile var ise çevre karaciğer dokusu-

SUMMARY: Examination of the kinetics of the tumors such as hepatocellular carcinoma (HCC) has proven to be useful in the detecton of their unpredictable biological behaviors.

In this study the kinetical features of 10 HCC materials sent to our department between the years 1984-1990, were studied employing various methods. Histological specifications of the materials were analyzed primarily and then to determine the proliferation capacity: Mitotic activity, staining with anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) were evaluated and DNA content, DNA index(DI), S-phase cells were calculated by flowcytometry(FCM).

Mitotic activity was found to be insufficient in determining the proliferation capacity. Results obtained from anti-PCNA staining on the other hand showed parallelism with DI and S-phase cell ratio results.

Key words : Hepatocellular carcinoma, PCNA, flowcytometry

nun özellikleri (hepatit, siroz, nekroz gibi) değerlendirildi.

Proliferasyon kapasitesi için mitotik hücreler sayıldı, immünohistokimyasal olarak anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ile boyama yapıldı, flovisitometri ile DNA içeriği, indeksi ve S fazı hücre oranı belirlendi.

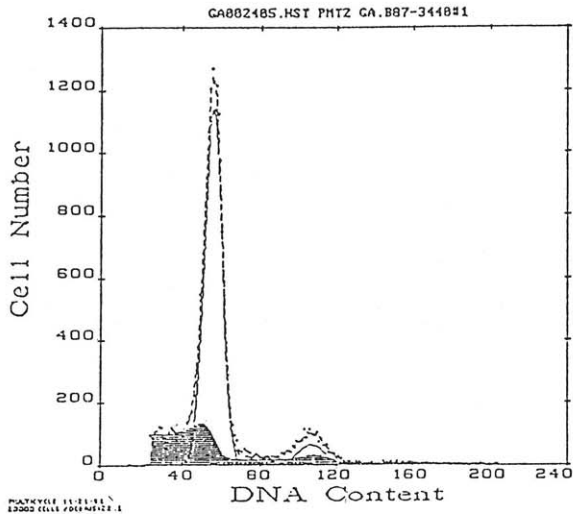
Mitotik aktivite; yarı kantitatif bir metotla değerlendirildi. Tüm materyaller büyük büyütme (x400) ile taranarak tipik-atipik mitozlar sayıldı ve ortalamaları alındı. Ortalama sayısı 0-1 olan seyrek, 2-3 olan orta, 4 ve üstü sık mitoz olarak kabul edildi.

İmmünohistokimyasal (IHK) inceleme için anti-PCNA (monoklonal, Coulter Clone 6604542) ile avidin-biyotin (ABC-Vector) yöntemiyle indirekt boyama yapıldı. Pozitif kontrol olarak kolon adenokarsinomu kullanıldı. Ayrıca primer antikorun uygulanmadığı metod kontrolü de yapıldı. Sadece nükleer boyanma dikkate alındı. Boyanan nükleusların tüm nükleuslara oranı x400 lük büyütmede sayılarak belirlendi ve oranı %25'e kadar ise +1, %26-50 arası ise +2, %51-75 arası +3, %76-100 arası +4 olarak kabul edildi (6).

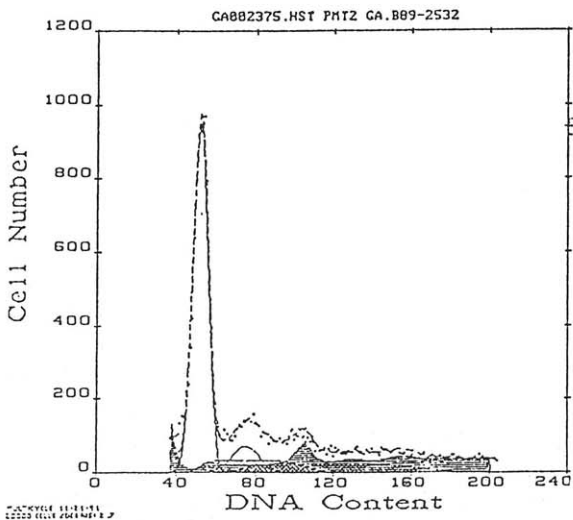
Flovisitometri (FSM) ile analiz için 4 adet 50 mikronluk kesit alınarak ksilolde deparafinize edildi ve dereceli alkollerden geçirildi. Pepsin ile parçalanmadan sonra DNA boyaması için propidyum iyodid kullanıldı.

Materyaller Epics Elite FSM (Coulter Electronics Hialeah, FL) ile analiz edildi. Işın kaynağı 488nm. eksitasyon veren 15 mw argon lazerdi. Floresan emisyonu 610 nm.de ölçüldü. Örneklerde 10000-20000 nükleus analiz edildi.

Histogramda diploid (fig. 1) G0 G1 pikinden başka bir pik olduğunda anaploidi (fig. 2) olarak yorumlandı. Ploidiyi kantitatif değerlendirmek için anaploid G0G1 piki hücrelerin diploid G0G1 piki hücrelerine oranını belirleyen DNA indeksi (DI)

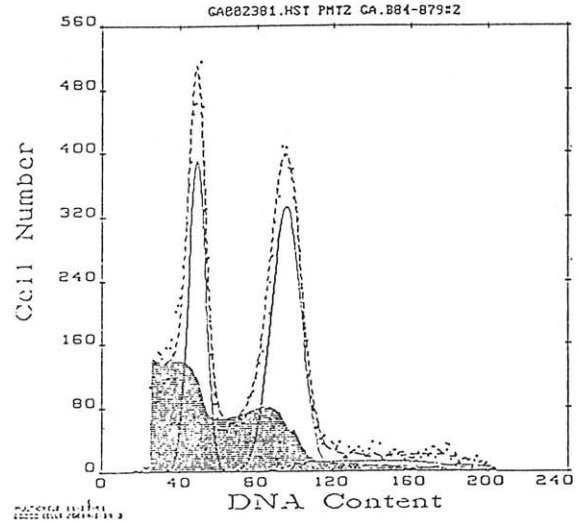


Figür 1: Diploid tümör örneği (DI: 1.0)



Figür 2: Diploid tümör örneği (DI: 1.4)

çalışıldı. DI diploid tümörlerde 0.9-1.1 arası ; hipodiploid tümörlerde 0.9'dan küçük, hiperploide 1.1-2.1 ve hipertetraploidlerde ise 2.1'den büyüktür (2). Ek olarak proliferatif kapasitenin göstergelerinden biri olan "S" fazı hücre oranı saptandı. Bu iki parametre (DI ve S fazı oranı) multicycle analiz programı (Phoenix Flow Systems San Diego CA) ile belirlendi.



Figür 3: Diploid tümör örneği (DI: 1.9)

BULGULAR

Vakaların 8'i (%80) erkek olup yaş ortalamaları 61.3 idi. Bir hastanın yaşı bilinmiyordu. Tümörlerin büyük kısmı pleomorfik hücrelerden oluşup (%60) az diferensiyel idiler. İki vaka (%20) hepatositik, bir vaka (%10) ksantoma benzeri sitolojik özellik gösteriyordu. Bir vakada da (%10) hem şeffaf hem eozinofilik hücrelerin oluşturduğu mikst hücreler görüldü. En fazla trabeküler olmak üzere sırasıyla kompakt ve asiner yapılanma gözlemlendi.

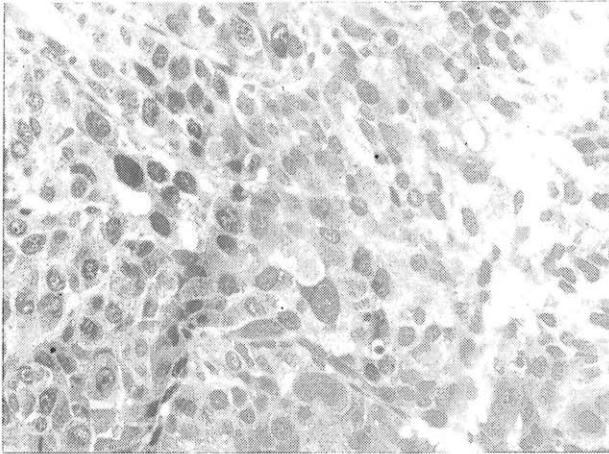
En sık mitoz pleomorfik tümörlerde görüldü, ancak mitozun sitolojik tip ve pattern ile belirgin bir korelasyon göstermediği sonucuna varıldı. Tablo 1'de vakaların yaş ve cinsiyetleri ile tümörlerin sitolojik tipleri ve mitotik aktiviteleri ile çevre doku aktiviteleri görülmektedir.

Anti- PCNA ile boyanma koyu nükleer boyanmadan nükleer membran altında belirgin, ince granüler görünüme kadar değişiyordu. (Resim 1) Boyanma yoğunluğu ne olursa olsun nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Vakaların birinde (vaka 6) teknik olarak boyanma sağlanamadı. Bunda olasılıkla immünohistokimya öncesi dokunun uğradığı hasarın etkisi vardı. Bir vakada ise

TABLO 1: Vakaların yaş, sitolojik tip ve mitotik aktiviteleri ve çevre doku özellikleri

Vaka	Cinsiyet	Yaş	Sitolojik Tip	Mitoz	çevre NT* doku
1	E	70	pleomorfik	sık	-
2	E	73	hepatositik	seyrek	+ hepatit
3	E	67	pleomorfik	sık	-
4	K	-	pleomorfik	sık	-
5	E	56	pleomorfik	sık	-
6	E	41	hepatositik	seyrek	+ siroz
7	E	45	pleomorfik	seyrek	+ siroz
8	E	65	pleomorfik	orta	+ siroz
9	K	70	şeffaf	seyrek	+ hepatit
10	E	65	mikst	izlenmedi	+ siroz

* NT: non-tümöral

**Resim 1:** 1: (x400) anti-PCNA ile + boyanmış nükleuslar (ABC-DAB kromojen)

(vaka 9) hiç boyanmış nükleus görülmedi. çevre siroz yada hepatitik karaciğer dokusunda PCNA ile boyanma görülmedi. Tablo II'de vakaların anti-PCNA ile boyanma dereceleri belirtilmiştir.

FSM ile incelemede 5 tümör anaploid, 5 tümör de diploid bulundu. DI, diploid tümörlerde 1.0'dır. Anaploid tümörlerin ikisinde DI'i 1.9'un altında, üçünde üstünde idi. Bu üç tümörden biri tetraploiddi. (DI=2.7).

S fazı hücre oranı hemen tüm tümörlerde yüksek bulundu. Birden fazla piki olan anaploid tümörlerde S fazı oranları ortalaması alındı. Bir diploid tümörde (vaka 6) S fazı oranı düşük (%4) bulundu.

DI ve S fazı oranlarındaki çeşitlilik hem diploid hem de anaploid tümörlerin heterojen olduklarını ortaya koydu.

TABLO 2 : Vakaların anti-PCNA ile boyanma dökümleri

Vaka	PCNA boyanma derecesi
1	3
2	1
3	3
4	3
5	4
6	boyanmadı
7	2
8	1
9	0
10	1

Tablo III tümörlerin FSM ile analiz sonuçlarını göstermektedir.

TABLO 3 : Vakaların flovisitometrik analiz sonuçları

Vaka	ploidi	DNA indeksi (DI)	% S hücresi
1	anaploid	1.93	15
2	anaploid	1.7	36
3	anaploid	2.7	13
4	anaploid	2.7	23
5	anaploid	1.4	64
6	diploid	1	4
7	diploid	1	65
8	diploid	1	41
9	diploid	1	20
10	diploid	1	18

TARTIŞMA

Histolojik olarak benzer tümörlerin genotipik ve fenotipik farklılıklar gösterebildikleri bilinmektedir ve bu durum biyolojik davranış farklılıklarıyla sonuçlanmaktadır. Biyolojik davranışı belirlemede proliferatif kapasite yararlıdır(6). Biz de bu çalışmada farklı yöntemlerle proliferasyon ile ilgili bazı parametreleri ortaya koyduk (Tablo IV).

Mitotik aktivite bunların arasında değerlendirilmesi en kolay olanıdır. Ancak kesitlerin kalınlığı, biyopsi materyalinin büyüklüğü gibi durumlardan etkilenebilmektedir. Ayrıca karaciğer çekirdek pleomorfizmi ve aktivitesi açısından oldukça özel bir organdır. Sadece neoplastik olaylar değil başka etkenlere bağlı olarak da hiperkromazi, binükleasyon, mitoz görülebilmektedir (7). Nitekim PCNA mitozu seyrek olan 4 tümörden bi-

rinde (vaka 2) +1, diğerinde (vaka 7) +2 oranında pozitif bulunmuştur. Ayrıca her iki tümörün S fazı hücre oranları da çok yüksek bulunmuştur (%36, %65). Hiç mitoz görülmemiş vakada ise (vaka 10) yine PCNA +1, S fazı oranı da %18'dir. Bu bulgular mitotik aktivitenin proliferatif aktiviteyi belirlemede yeterli olmadığını göstermektedir.

TABLO 4 : Proliferasyon kapasitelerini belirlemede kullanılan parametrelerin vakalara göre dağılımı

Vaka	Mitoz	PCNA	Ploidi	DI	% S
1	sık	3	anaploid	1.93	15
2	seyrek	1	anaploid	1.7	36
3	sık	3	anaploid	2.7	13
4	sık	3	anaploid	2.7	23
5	sık	4	anaploid	1.4	64
6	seyrek	boyanmadı	diploid	-	4
7	seyrek	2	diploid	-	65
8	orta	1	diploid	-	41
9	seyrek	0	diploid	-	20
10	-	1	diploid	-	18

PCNA, 56 kd.luk intranükleer bir protein olup hücrede yapımı proliferasyon ve DNA replikasyonu ile ilişkilidir. Hücre siklusunun G1 fazı geç döneminde artmaya başlar ve S fazında en yüksek seviyeye ulaşır (6,8). Uyarılmamış hepatositlerde boyanma oranı %5'lerden düşük iken, uyarıldıklarında bu oran %60'lara yükselir (9,10). Vakalarımız arasında PCNA negatif olan ksantoma benzeri tümördü ki (vaka 9) literatürde de en yavaş büyüyen HSK'lardan olduğu belirtilmektedir (11). Mitotik hücrelerde boyanma olmaması PCNA'nın S fazı dışında saptanabilir düzeyin altında olması ile uyumludur.

FSM evre ve histolojik özelliklerden bağımsız olarak prognozun belirlenmesinde yararlıdır (12). HSK'larda çapı büyük tümörlerde anaploidinin ve intrahepatik yayılımın daha sık olduğu bildirilmiştir (13).

Bizim vakalarımızda da anaploid tümörlerde sık mitoz, yüksek PCNA pozitifliği ve yüksek S fazı oranı saptandı. DNA içeriği karaciğerde metabolik aktivite artışı ile de artar. Bu nedenle normal karaciğerde de dinlenme fazında bile tetraploid hücreler mevcuttur ve genellikle karaciğerde proliferatif hücrelerin oranı % 10.2'dir (14,15). Bu ne-

denle normal karaciğerde tetra ve hipertetraploid hücreler bulunabilir. HSK'larda da tetraploid ve hipertetraploidinin diğer tümörlerden sık görüldüğü bilinmektedir (16). Nitekim bizim anaploid 5 vakamızın biri tetraploid (vaka 1), ikisi hipertetraploid idi. Yüksek DI'lı HSK'ların düşük DI'liliere oranla daha iyi prognoz gösterdikleri bilinmektedir (16). Nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte yüksek DI olan tümörlerde daha fazla G2 fazında tetraploid hücrelerin olabileceği ve bunların da birikimci amaçlı DNA'larını arttırdıkları varsayılmaktadır (16). S fazı yüksek tümörler genellikle kötü prognoz gösteren tümörlerdir. Aynı zamanda tedaviye en duyarlı hücreler de bu hücrelerdir. Biz de çalışmamızda tetraploid ve hipertetraploid olan tümörlerimizde diğer anaploid tümörlerden daha düşük S fazı oranı bulduk ki bu tetra ve hipertetraploid tümörlerin daha düşük proliferasyon kapasiteleri olabileceğini düşündürmüştür.

Anaploid tümörlerden sadece birinde (vaka 2) mitoz ve PCNA boyanma oranı FSM sonuçları ile çok uyumlu değildi. Bu vakada çevre dokuda hepatit olup diğer anaploid tümörlerde çevre doku mevcut değildi. Olasılıkla bu tümördeki DI ve S fazı oranı yüksekliği çevredeki inflamatuvar hücrelere bağlıdır ki tümöral ve non-tümöral hücreleri ayırmamak FSM'nin bu çalışmadaki zayıf noktasıdır.

S fazı oranları çok yüksek olan 2 diploid tümörün (vaka 7 ve 8) histogramlarında çok geniş G0G1 piki olması bir hipodiploid anaploidiyi düşündürmektedir. Bir kısım küçük HSK'larda beklenmedik hızlı büyüme görüldüğü ve bunların FSM ile hipodiploidik anaploid oldukları literatürde de bildirilmiştir (16). Diğer diploid tümörlerden birinde S fazı düşük, ikisinde orta derecede yüksektir. Ancak PCNA boyanma oranı düşüktür. Bu tümörlerde de çevre sirotik karaciğer dokusunun FSM sonuçlarını etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Non-tümöral karaciğer dokularında FSM ile analiz az sayıdaki çalışmada bildirilmiştir (9,10,17). Bunlardan birinde tümöre komşu özellikle sirotik alanlarda hafif düzeyde DNA içerik anormallikleri olabildiği rapor edilmiştir (17). Sonuç olarak, proliferatif kapasitenin değerlendirilmesinde mitozun yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. FSM ile anaploid ve diploid tümörlerin DI ve S fazı oranları bakımından heterojenite gösterdikleri saptanmıştır. PCNA ile alınan sonuçların DI ve S fazı oranlarına paralel olduğu gözlenmiş ve HSK'lar için PCNA'nın FSM'ye benzer anlamda sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. DeLelis RA. Proliferation markers for neoplasms of the nervous system. *Advances in immunohistochemistry* Raven Press 1988;301-302.
2. Coon JS, Landay AL, et al. Biology of diseases, advances in flowcytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; 57 (5): 453-479.
3. Ezaki T, Kanematsu T, et al. DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. *Cancer* 1988; 61: 106-109.
4. Wenming C, Mengchao W. The biopathologic characteristics of DNA content of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990; 66: 498-501.
5. Ng IO, La EC, et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1994; 73 (9): 2268-2274
6. Garcia RL, Coltrera MD, et al. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies with flowcytometric analysis. *Am J Pathol* 1989; 134 (4): 733-739.
7. Watanabe I, Tanaka Y. Age related alterations in the size of human hepatocytes. *Virchows Archiv. Cell Pathol B* 1982; 39: 9-20.
8. Goland 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.
9. Zhao M, Zhang NX, et al. Three types of liver cell dysplasia in small cirrhotic nodules are distinguishable by karyometry and PCNA labelling and their features resemble distinct grades of hepatocellular carcinoma. *Histol histopathol* 1994; 9 (1): 73-83
10. Ballardini G, Graff P. Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. *J Hepatol* 1994; 20 (2): 218-222
11. Anthony PP. 16. Tumours and tumour-like lesions of the liver and biliary tract. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Portmann BC. Editors. *Pathology of the liver*. 3rd. ed. Churchill Livingstone 1994: 635-711.
12. Valenzuela R, Hurtubise PE. Flowcytometry. Basic principles and clinical applications. *ASCP National Meeting* 1992; 1-79.
13. Akashi Y, Koreeda C et al. Prognosis of unresectable carcinoma: An evaluation based on multivariate analysis of 90 cases. *Hepatology* 1991; 14:262-268.
14. Arad DS, Zajicek G, et al. The streaming liver IV: DNA content of the hepatocyte increases with its age. *Liver* 1988; 9: 93-99.
15. Zajicek G, Schwartz D. The streaming liver VII: DNA turnover in acinus zone 3. *Liver* 1990; 10: 137-140.
16. Fujimoto J, Okamoto E, et al. Flowcytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1991; 67: 939-944.
17. Lin HH, Shyu WC, et al. DNA measurements in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1990; 10: 313-318