

**I.U. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**ENDOMETRIUM ADENOKANSERİNDE
DNA İÇERİĞİNİN PROGNOSTİK DEĞERİ**

**Dr. Semih KALELİ
(Uzmanlık Tezi)**

İstanbul - 1993

31443.

TESEKKUR

Uzmanlık eğitimim süresince çok değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum , basta Anabilimdalı başkanımız sayın Prof. Dr. Aykut Kazancıgil olmak üzere , kliniğimizin değerli tüm öğretim üye ve elemanlarına tesekkürü borç bilirim.

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında özel ilgi ve emeğini esirgemeyen sayın Prof.Dr.Derin Kösebay'a , sayın Prof.Dr. Turqay Atasü'ye ve sayın Doc.Dr.Macit Arvas'a, çalışmanın yapılabilmesi için arşivlerini kullanmama olanak tanıyan Jinekolojik Onkoloji Bilimdalı başkanı sayın Prof.Dr.Enqin Erkün'e ve Radyoterapi Anabilimdalı başkanı sayın Prof. Dr. Sait Okhan'a, eğitimimde büyük katkıları olan sayın Doc.Dr.Kılıc Aydınlı ile sayın Doc Dr.Fahri Öcer'e, çalışmada karşılaştığım güçlükleri paylaştan sayın Uz.Dr Fuat Demirkıran , sayın Dr. Özlem Cokar ve sayın Dr. Fatmanur Karaköse'ye ayrıca tesekkür ederim.

Sahip olduğu çok özel araştırmacı ve özverili kişiliğiyle çalışmanın gerçekleştirilmesinde çok büyük katkıları olan sayın Doc.Dr.Nezih Hekim'e , sayın Dr.özge Alper Gürqen'e ve Pakize i.Tarzi Laboratuvarının değerli çalışanları ile sonuçların istatistik analizinde gösterdiği nazik ilgilerinden dolayı sayın Yard. Doc. Dr. Mahmut Özşahin'e tesekkürlerimi sunarım.

Dr. Semih Kaleli
Ocak 1993, İstanbul

Semih Kaleli

F.G. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

GİRİŞ

İnsan solid tümörlerinde DNA içeriğinin normalden saoma gösterdiği bugün artık genel kabul gören bir gerçektir. Bu gözlemin biyolojik anlamının olup olamayacağı konusu çalışmacıların ilgisini çekmektedir. Tümör hücresindeki DNA'nın normal hücre DNA'sından farklı olması tümördeki anormal ve aşırı derecedeki hücre proliferasyonunu açıklayabilir. Dolayısıyla bu farklılığın derecesi de hastalığın klinik seyrile ilişkili olabilir.

İnsan tümörlerinde tümör hücresinin içerdiği DNA'nın özelliklerinin (anöloidi-diploidi, proliferatif indeks, DNA indeksi) hastalığın seyrinde prognostik değeri olabileceği ileri sürülmektedir. Gastrointestinal ve ürolojik kanserler basta olmak üzere birçok kanserde (1-20) ve bu arada jinekolojik kaynaklı tümörlerde de DNA'nın prognostik değerine ilişkin çalışmalar yapılmaktadır (21-50).

Jinekolojik kaynaklı kanserler içinde tümör hücresinin DNA içeriği ile prognosis bağlantısını araştıran çalışmalar daha çok over kanserinde yoğunlaşmıştır. Over kanserinde tümör hücresindeki DNA'nın bağımsız bir prognostik parametre olduğu saptanmıştır (29-46). Daha az sayıda çalışmanın yapıldığı serviks kanserinde ise çalışmalardan anöloidi ve S fazı değerlerinin prognostik değeri açısından birbirivle çelişen sonuçlar alınmaktadır (21-28). Endometrium kanserinde de önceli olarak az sayıda DNA çalışması yapıldığını söylemekteyiz (51-72). Endometrium kanserinde DNA içeriğinin prognostik değerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar over kanserinde elde edilenlere yakın sonuçlar vermektedir. Ancak şimdiye dek yapılmış az sayıda çalışmada elde edilen sonuçlarda tam fikir birliği yoktur.

Endometrium kanserinde bilinen prognostik parametrelerle açıklanamayan hastalık nüksleri çalışmacıları yeni prognostik parametrelerin araştırılmasına itmektedir. Bugün klasik kitaplara geçmiş prognostik parametrelerin sayısı 13'e ulaşmıştır. Doğal olarak her parametrenin aynı derecede önemli olması da beklenemez. Bu çalışmanın amacı endometrial adenokanserde tümör hücresindeki DNA içeriğinin prognostik değerini araştırmak ve bir prognostik faktör olduğu saptanırsa, evre, histolojik grade ve myometrial invazyon gibi bilinen kuvvetli prognostik parametrelere göre değerini önceli olarak belirlemektir.

GENEL BİLGİLER

ENDOMETRIUM KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Endometrium kanseri A.B.D de en çok görülen jinekolojik kanserdir. İngilterede ise serviks kanserinin ardı dan ikinci sırada yer almaktadır . A.B.D de her yıl 35 000 yeni endometrium kanseri vakasına rastlanmaktadır (73). Ülkemizde de serviks kanserinden sonra en sık görülen kanserdir (ancak Türkiyede güvenilir istatistiki veriler yoktur).

Endometrium kanserinin ortalama görülme yaşı 61 dir . Hastaların çoğu 55-59 yaş grubundadır. Vakaların % 75-80 i postmenopozal dönem kadınlarıdır (74). Sadece % 5 hastanın 40 yaş altında olduğu bildirilmektedir (75).

Menopoza ulaşan kadınların 75 yaşına gelene dek % 1-3 ünün endometrium kanseri olacakları (76,77) ve bunların bilinen şekilde tedavilerinden sonra % 20 sinin 5 yıl içinde kaybedilecekleri hesaplanmıştır (78-80). Endometrium kanseri bu yüksek insidansa rağmen ölüme neden olan kanserler içinde daha alt sıralarda yer almaktadır (73,81). Bunun nedeni hastaların % 80 inde evre I aşamasında iken hastalığın tespit edilebilmesidir. Endometrium kanserinin artması ve serviks kanserinin azalması sonucunda pek çok ülkede endometrium kanseri jinekolojik kanserler içinde ilk sırada yer almaya başlamıştır. Endometrium kanserinin relatif ve mutlak insidansındaki artışın nedenleri şunlardır (82):

- 1- Bazı ileri batı toplumlarında düzenli periyodik muayene alışkanlığı ve gelişen erken tanı yöntemleri (servikovaginal smear, kolposkopi vb.) yardımıyla serviksin preinvaziv lezyonlarının invaziv kansere dönüşmeden tanınması serviks kanserinin insidansını önemli oranda azaltmıştır. Aynı nedenle tanı koyulan endometrium kanseri vakalarının sayısı da artmıştır.
- 2- Endometrium kanseri tanısındaki kriterlerin daha geniş tutulması bildirilen vaka sayısını artırmıştır.
- 3- Batı toplumlarında 1970 li yıllarda yaygın olarak progesteronla karşılanmamış , yüksek dozda östrojen içeren kontraseptifler kullanılmıştır.
- 4- Daha çok postmenopozal dönemde görülen bir kanser olan endometrium kanserinin , ortalama yaşam süresinin artması sonucunda rastlanma olasılığı artmıştır
- 5- Yaşlanan kadın popülasyonunda menopozdaki östrojen replasman tedavisinin daha fazla oranda kullanılır hale gelmesi sonucunda endometrium kanserinin insidansında artış görülmüştür.

östrojenlerin artmış kullanımı, endometrium kanserindeki artışın sorumlusu olarak suçlanmasına rağmen , östrojen kullanımının son derece kısıtlı olduğu Norveç ve Çekoslavakya gibi ülkelerde de hastalık artma eğilimindedir (83).

Endometrium kanseri jinekolojinin önemli problemlerinden birisi olmaya devam etmektedir. Endometrium kanseri diğer jinekolojik malignansilerden farklı olarak önceden kestirilemeyen bir klinik seyir takip eder. Evre, grade, myometrial invazyon vb. gibi prognostik faktörlere bağlı olarak klinik davranış da değişmektedir. Dolayısıyla tedavi de kişiye özel olarak farklı olmaktadır. Endometrium kanserinde bilinen prognostik faktörlere göre düzenlenen tedavi şemaları bazen hiç beklenmedik şekilde başarısızlıkla sonuçlanabildiğinden , standart tedavi şemalarının oluşturulmasında güçlükler vardır. Bunun nedeni tümörün biyolojik davranışını etkileyen prognostik faktörlerin sayı ve varyasyonundaki çeşitliliklerdir (84).

ENDOMETRIUM KANSERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLER

- 1) Yaş: Endometrium kanseri ağırlıklı olarak perimenopozal dönemde ortaya çıkan bir kanserdir. Ortalama görülme yaşı 61 dir (73). Vakaların 3/4 ü postmenopozal dönemdeki kadınlardır. Sadece % 5 i 40 yaş altındadır (74).

Frick ve arkadaşları evre I deki hastalarda 59 yaşın altında hastalığın daha iyi seyrettiğini saptamışlardır. 60 yaş üstünde 5 yıllık yaşam şansı % 56 iken , 59 yaş ve altında bu oran % 80 e çıkmaktadır (85). Jones bunu, daha erken yaşta görülen kanserlerin daha küçük ve kısmen daha erken evrede olmasına, myometrial invazyonun fazla oranda olmamasına ve tümörün daha iyi diferansiye olmasına bağlamıştır (86).

- 2) Evre: Tümörün tedavi öncesi dönemdeki evresinin prognozunu etkilediği bildirilmektedir. Halen FIGO'nun tanımladığı, klinik ve cerrahi evreleme olmak üzere iki farklı evreleme sistemi uygulanmaktadır (Tablo I ve II).

Endometrium kanserinin evrelemesi 1989 a kadar klinik evreleme sistemine göre yapılmıştır. Klinik-FIGO evreleme sistemi klinik bulgulara dayalı olarak yapılmaktadır. Klinik evrelemede palpasyon, inspeksiyon, endoservikal küretaj, histeroskopi, sistoskopi, proktoskopi, histerografi ve kemik ve akciğer grafilerinden yararlanılabilir. Lenfanjiografi, arteriografi, venografi laparoskopi gibi rutin olarak her klinikte olmayan ve değerlendirilmesi yoruma açık olan yöntemler klinik evrelemede kullanılmamaktadır.

Klinik evreleme sistemine göre hastalık % 75 oranında evre I olarak sınıflanmakta ve kalan vakalar diğer evrelere eşit olarak dağılmakta idi. Hastaların evre I de yığılması evrelemenin değerini azaltmıştır. Bu nedenle FIGO ameliyat sırasındaki bulguları ve histopatolojik inceleme sonuçlarını da dikkate alan yeni bir evreleme sistemi geliştirmiştir. Ayrıca myometrial invazyon, periton sitolojisi, lenf ganglionlarının tutulması ve servikal tutulum gibi önemli prognostik değeri olan faktörlerin evrelemeye alınması, uterus büyüklüğü gibi subjektif ve fazla değeri olmayan bir parametrenin evrelemeden çıkarılması gereksinimi doğmuştur. Klinik evreleme ile ameliyat sırası ve sonrasında yapılan cerrahi-patolojik evreleme arasında yaklaşık % 20-30 fark olmakta ve hastalığın cerrahi evrelemesi genellikle daha yüksek olmaktadır. Böylece hastaların risk gruplarına göre dağılımının yapılabilmesi ve ek tedavi isteyen hastaların belirlenerek tedavisinde standart yöntemlerin uygulanması ve tedavi sonuçlarının eşdeğer tarzda karşılaştırılması mümkün olabilecektir. Klinik evreleme ameliyat olmayacak, radyoterapi yapılacak hastaların takibinde kullanılmaya devam edecektir.

Tümörün servikse uzanması uterus korpusunda sınırlı lezyonlara oranla daha kötü seyirli olmaktadır. Endoservikal tutulum olmuşsa 5 yıllık yaşam şansı % 80 den % 50 ye inmektedir (87). Rutledge endometrium kanserli hastaların % 11.6 sında (881/7561) servikal tutulum olduğunu göstermiştir (88). Servikal tutulum vakaların ancak % 27 sinde ameliyat öncesinde saptanabilmektedir. Vakaların % 66 sında servikal yayılım "occult" kalmakta ve ancak çıkarılan uterusun histopatolojik muayenesi sırasında tespit edilebilmektedir (89). Bu tümörün servikse direkt yayılma dışında lenfatikler yoluyla da yayılabildiğini göstermektedir. Kadar ve arkadaşları evre II hastaların % 65 inde servikal mukoza tutulmadan stromada malign hücrelerin varlığını saptamıştır (90). Bu nedenle evre II deki hastaların önemli bir kısmında servikal tümör "occult" kalmaktadır ve tanısal amaçla yapılan endoservikal küretajla yakalanamamaktadır. Serviksteki tümör endoservikal mukozadan uzakta izole adacıklar halinde ise bu hastalarda prognoz değişmemekte ve evre I gibi olmaktadır ancak tümör servikal mukoza ile devamlılık gösteriyorsa prognoz etkilenmekte ve 5 yıllık yaşam şansı % 70 den % 65 e inmektedir (91).

Ayrıca kavite içersinde tümörün lokalizasyonu da etkili olmaktadır. Fundusa yakın lezyonların serviksi tutma şansı daha az olduğundan hastalığın seyri daha alt seviyede yerleşenlere göre daha iyi olmaktadır. Evre I deki lezyonların % 92 sinin uterus fundusunda yerleştiği saptanmıştır (87).

Endometrium kanserinde klinik ve cerrahi evrelere göre sağkalım oranları tablo III de verilmiştir.

Evre 0	Atipik endometrial hiperplazi, in situ karsinom
Evre I (G 1,2,3)	Korpusta sınırlı karsinom
Ia	Uterus kavitesinin boyu 8 cm veya daha kısa
Ib	Uterus kavitesinin boyu 8 cm den uzun
Evre II	Karsinom korpus ve serviksi tutmuş fakat uterus dışına taşmamıştır
Evre III	Karsinom uterus dışına taşmış ancak pelvis dışına geçmemiştir
Evre IV	Karsinom pelvis dışına yayılmış ya da mesane ya da rektum mukozasını belirgin olarak tutmuştur
IVa	Mesane, rektum, sigmoid veya ince barsak tutulmuş
IVb	Uzak organ metastazı vardır

Tablo I . Endometrium kanserinde eski FIGO evrelemesi (klinik evreleme)

Evre Ia	G 1,2,3	Tümör endometriyumda sınırlı
Evre Ib	G 1,2,3	Myometriyum 1/2 sinden azında invazyon var
Evre Ic	G 1,2,3	Myometriyum 1/2 ve ötesinde invazyon var
Evre IIa	G 1,2,3	Sadece endoservikal glandlarda tutulum var
Evre IIb	G 1,2,3	Servikal stromal invazyon var
Evre IIIa	G 1,2,3	Uterus serozası ve/veya adneksler tutulu ve/veya periton sitolojisi pozitif
Evre IIIb	G 1,2,3	Vagina metastazı var
Evre IIIc	G 1,2,3	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodüllerinde metastaz var
Evre IVa	G 1,2,3	Tümör mesane ve/veya barsak mukozasını tutmuştur
Evre IVb	G 1,2,3	Intraabdominal ve/veya ingüinal lenf nodülü metastazı dahil uzak organ metastazları var

Tablo II . Endometrium kanserinde yeni FIGO evrelemesi (cerrahi evreleme)

Evre	Klinik		Cerrahi	
	N	%	N	%
I	2824	76.3	2132	85.3
II	531	59.2	238	70.2
III	120	29.4	189	49.2
IV	23	10.3	19	18.7
Evre ?	8	51.8	1	50.8
TOTAL	3506	66.9	2579	77.5

Tablo.III. Endometrium kanserinde 5 yıllık sağkalım , klinik evreleme/cerrahi evreleme (Annual Report , Stockholm , FIGO, 1991, vol 36.)

- 3) Histolojik Grade: Tümörün histolojik olarak farklılaşma derecesinin en önemli prognostik parametrelerden olduğu iddia edilmektedir (86,87). Histolojik grade için halen birden fazla grade sistemi uygulanmaktadır. Bu sistemler tümördeki glandüler/solid alan oranını ya da tümör hücrelerinin morfolojik özelliklerini veya her ikisini birden dikkate alarak oluşturulmuştur (Tablo IV).

FIGO yaptığı sınıflamada 3 dereceli bir sistem benimsemiştir:

- Grade 1 : iyi diferansiye tümör
Grade 2 : Kısmen diferansiye veya yer yer solid alanlar içeren tümör
Grade 3 : Ağırlıklı olarak solid ya da tamamen andiferansiye tümör

Tablo IV . FIGO grade sistemi (1967)

Daha açık olarak, grade I tümörün % 98 veya daha üzerinde bir kısmının glandüler veya papiller yapılardan oluşmasını, grade II % 20-50 si oranında solid alanlar içeren kısmen diferansiye tümörü, grade III ise % 50 den fazla solid alan içeren andiferansiye tümörü ifade eder (92).

GOG grubu ise (The Pathology Committee of the Gynecologic Oncologic Group) grade I i % 5 den daha az solid kısım içeren iyi diferansiye tümör, grade II yi % 5-50 oranında solid alan içeren kısmen diferansiye olmuş tümör ve grade III ü de % 50 den daha fazla solid kısım içeren diferansiye olmamış tümör olarak tanımlamıştır (93). WHO ve diğer bazı araştırmacılar ise bu kriterlere mitotik aktivite ile çekirdek ve nukleolus özelliklerini de eklemekte ve bunun sonunda bir grade belirlemektedir (94,95).

Sadece çekirdek morfolojisine göre dereceleme yapıldığında az sayıda mitoz olan, çekirdeği oval ya da fusiform şekilli, belirgin nukleolus içermeyen, kromatini düzenli dağılmış hücreler grade I, çok sayıda mitoz olan, büyük nukleoluslar içeren büyük ve irregüler çekirdeği olan hücreler ise grade III olarak tanımlanmıştır. İkisinin arasındaki özellikler grade II yi oluşturur (95,96). Histolojik grade ile uyumlu olmayan çekirdek bulguları tespit edildiğinde grade I grade II, grade II de grade III olur. Seröz papiller karsinom, berrak hücreli karsinom ve skuamöz karsinomda çekirdek grade'i öncelik kazanır. Skuamöz komponenti olan adenokarsinomda grade adenokarsinom komponentine göre belirlenir. Yeni FIGO evreleme sisteminde çekirdek bulguları da dikkate alınmıştır (Tablo II).

Grade	Evre I		Evre II		Evre III		Evre IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I	2455	49	596	35	182	28	57	19
II	1863	37	661	39	54	40	102	34
III	729	14	347	26	202	32	137	45
Total	5047		1704		638		296	

Tablo V. Endometrium kanserinde evreye göre grade dağılımı (Annual Report, Stockholm, FIGO, 1991, vol 36).

Jones daha önce yapılan çalışmalarını dikkate alarak yaptığı araştırmada 5 yıllık yaşam şansının grade I lezyonlarda ortalama % 81, grade II lezyonlarda % 74 ve grade III lezyonlarda % 50 olduğunu belirlemiştir (86). Grade arttıkça myometrial invazyon oranı ve lenfatik tutulum oranı da artmaktadır (95,97,tablo VI) . Creasman evre I endometrium kanserinde derin myometrial invazyonun grade I de % 10 dan grade III de % 42 ye yükseldiğini göstermiştir (95,tablo VII).

Grade	n	pelvik (%)	paraaortik (%)
I	180	3	2
II	288	9	5
III	153	18	11
TOTAL	621	9.3	5.4

Tablo VI. Evre I endometriyum kanserinde grade'e göre pelvik ve paraaortik lenf ganglionu tutulumu (Greasman, 1987).

Grade	Myometrial invazyon			
	Inv. yok	Yüzeysel	Orta	Derin
I	% 24	% 53	% 12	% 10
II	% 11	% 45	% 24	% 20
III	% 11	% 35	% 16	% 42

Tablo VII. Evre I endometriyum kanserinde grade'e göre myometrial invazyon oranı (n=621) (Greasman, 1987)

- 4) Myometrial invazyon : Tümörün myometriuma penetrasyon derecesi tümör virulansının bir ölçüsüdür. Yapılan çalışmaların hemen tamamında myometriuma invazyon önemli bir parametre olarak bulunmaktadır. Boronow 222 hastada yapılan çalışmada evre I endometriyum kanserinde tümörün % 41'inin endometriumda sınırlı kaldığını, % 26'sında myometriyumun 1/3 proksimalini infiltre ettiğini, % 7.7'sinde myometriyum orta 1/3 üne ve % 14.9'da da myometriyumun distal 1/3 üne ulaştığını göstermiştir. Adenokarsinomun myometriuma invazyonunu belirlerken uterusu daha önceden var olan adenomyozisin invazyonla karıştırılmaması gerekir (98).

Lutz ve ark. ise asıl önemli olanın tümörün uterin serozaya yaklaşma mesafesi olduğunu iddia etmektedir. 5 yıllık yaşam şansı seroza-tümör mesafesi 5 mm nin altında ise % 65, 10 mm nin üzerinde ise % 97 olmaktadır (99).

Penetrasyonun derecesi diğer parametrelerle paralel seyretmektedir. Derin invazyon durumunda lenfatik tutulum oranı da artmaktadır (95, tablo VIII). Invazyon derecesi tümör grade'i ile de korelasyon göstermektedir. Derin myometrial invazyona yol açan tümörlerin yaklaşık yarısı grade III tümörlerdir. Diferansiye olmamış tümörler ve

derin myometrial invazyon lenf ganglionlarının tutulma oranını belirgin olarak artırmaktadır (98, tablo VI ve VIII).

Myometrial inv.	n	Pelvik (%)	Paraaortik (%)
inv. yok	87	% 1	% 1
Yüzeysel	279	% 5	% 3
Orta	116	% 6	% 1
Derin	139	% 25	% 17

Tablo VIII. Evre I endometriyum kanserinde myometrial invazyon derecesine göre pelvik ve paraaortik lenf ganglionu tutulumu (Creasman 1987)

Myometrial invazyon derecesi arttıkça 5 yıllık yaşam şansı da önemli oranda azalmaktadır (Tablo IX).

Evre	yüzeysel inv.		orta inv.		derin inv.	
	n	%	n	%	n	%
I	891	90.0	428	82.8	470	78.5
II	58	73.8	52	76.3	93	66.3
III	40	64.4	33	59.9	87	44.5
IV	1	14.6	4	28.2	12	22.4

Tablo IX. Endometriyum kanserinde myometrial invazyon oranına göre 5 yıllık yaşam şansı (cerrahi evreleme) (Annual Report, Stockholm, FIGO, 1991, vol 36).

Primer tedaviden önce myometrial penetrasyonun derecesini tayin etmek için ultrasonografik tetkik, histerografi veya tomografi önerenler vardır, ancak primer olarak cerrahi yöntemle tedavi edilecek kişiler için bu araştırmalar gerekli değildir.

- 5) Periton sitolojisi : Tüm pelvik tümörlerde olduğu gibi endometriyum kanserinde de periton yıkama sıvısında sitolojik inceleme yapılır. Laparotomi sırasında intraperitoneal mesafeye girildiği anda eğer mevcut bir sıvı yoksa 100-125 ml fizyolojik serumla periton yıkanarak örnek alınır (100).

Creasman ve Rutledge tedavi edilmemiş 167 evre I endometrium kanserinde % 15.5 oranında malign hücreye rastladıklarını bildirmektedirler . Bu hastaların % 34 i hastalığın tekrarlaması nedeniyle kaybedilirken , sitolojik inceleme sonucu negatif olan hastalarda tekrarlayan hastalık sonucunda hastaların sadece % 10 u kaybedilmiştir (101).

Ancak Yazigi ve ark. 93 hastada yaptıkları çalışmada (102) pozitif sitolojik bulgu saptanan grupta % 10 hastada , negatif sitolojik bulgu saptanan grupta % 7 hastada hastalığın tekrarladığını saptamışlardır. 10 yıllık yaşam oranları arasında da fark bulunamamıştır. (% 87.5 ve % 92.5) . Kanski de 114 vakalık araştırmasında benzer sonuçları tespit etmiştir . Pozitif bulgu pelvik rekürens, ekstrapelvik yayılımı ve sağkalım oranlarını etkilememektedir (103). Periton sitolojisine ilişkin bulgular tablo X da özetlenmiştir.

Yazar	n	Pozitif	Negatif
Creasman ve ark. (1981)	167	% 34	% 9.9
Yazigi ve ark. (1983)	93	% 10	% 7
Kanski ve ark. (1988)	114	% 10	% 5

Tablo X. Evre I endometrium kanserinde periton sitolojisi bulgularına göre hastalığın rekürens oranları

606 çalışmasında pozitif sitolojik bulgunun artmış pelvik lenf nodu tutulumu ile birlikte olduğu tespit edilmiştir 621 hastanın 76 sinda (% 12) peritonda malign hücre saptanmış ve pozitif bulgu veren hastaların % 25 inde pelvik lenf ganglionlarının tutulu olduğu saptanırken , peritonda malign hücreye rastlanmayan hastalarda pelvik lenf ganglionlarının % 7 sinde tutulum gösterilmiştir (101).

Bu çalışmaların sonuçları arasındaki farklar açıklanamamıştır . Nedenin yıkama sıvısındaki hücre konsantrasyonu olabileceği ve yıkamanın aynı miktarda sıvıyla yapılması gerektiği bildirilmektedir . 100 ml yıkama sıvısında 1000 den az hücre olanlarda rekürens oranı daha fazla hücre olanlara göre düşük bulunmaktadır (104).

6) Lenf nodu tutulumu: Endometrium kanserinde pelvik lenf ganglionlarının tutulması 1900 yılından bu yana bilinmektedir. 1952 de Javert 50 hastada evreden bağımsız olarak % 28 oranında pelvik lenf ganglionu tutulumu bildirmiştir (105). Daha sonra yapılan çalışmalar benzeri sonuçlar vermiş (Tablo XI) ve 1987 de GOG çalışmasında 621 evre I endometrium kanseri vakasında % 9.3 oranında pelvik ve % 5.4 oranında paraaortik lenf ganglionu tutulumu gösterilmiştir (101).

Yazar	Evre I		Evre II	
	n	Ganglion	n	Ganglion
Randall	20	4 - Evre ?		
Brunschwig	57	10 - Evre ?		
Liu ve Meigs	33	4	14	7
Lefevre	37	3	1	1
Schwartz ve Brunschwig	14	2	12	4
Roberts	22	5	8	2
Anderson ve Stephens	52	4 - Evre ?		
Barber ve ark.	85	12 - Evre ?		
Davis	56	7 - Evre ?		
Parsons	50	4 - Evre ?		
Hawksworth	64	8	11	6
Winterton	76	8 - Evre ?		
Rickford	36	2	9	2
Lees	56	3	8	4
Morris	21	4 - Evre ?		
Lewis ve ark.	107	12	22	5
Stallworthy	131	18 - Evre ?		
Boronow	222	23	-	-
GOG	621	58	-	-
Total	1202	131 (% 10.9)	85	31 (%36.5)

Tablo XI. Endometrium kanserinde pelvik lenf ganglionu tutulumu (Coppleson 1992'den değiştirilerek).

GOG çalışmasında lenfatik metastazın uterus büyüklüğü, tümörün grade'i, myometrial invazyon derinliği ve tümörün uterustaki lokalizasyonu ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Derin myometrial invazyon ve andiferansiye tümörlerde pelvik ve paraaortik lenf tutulumu belirgin olarak artmaktadır (Tablo VI, VII).

Adenoskuamöz kanser, papiller seröz karsinom ve berrak hücreli karsinomun endometrioid adenokansere göre daha fazla lenf tutulumuna yol açtığı da gösterilmiştir . Schink ve arkadaşları adenokarsinomda % 9.3, adenoakantomada % 8.3, adenoskuamöz karsinomda % 28.6, papiller seröz karsinomda % 35.7 ve berrak hücreli karsinomda % 75 oranında lenf metastazı bildirmiştir (106)

Endometrium yüzeyinin 1/3 ten fazlasının tutulması, makroskopik servikal tutulum , uterus kavitesinin boyunun 8-10 cm den uzun olması (106) ve tümörün çapının 2 cm den büyük olması durumunda da (107) pelvik ve paraaortik lenf tutulumunun arttığı bildirilmektedir.

Nodal tutulum	Rekürens (%)
Pelvik	
Pozitif	57.0
Negatif	11.0
Paraaortik	
Pozitif	59.0
Negatif	11.0

Tablo XII. Evre I endometrium kanserinde nodal tutulumun rekürens etkisi (DiSaia 1985)

- 7) Histolojik tip: Berrak hücreli karsinoma , papiller seröz karsinoma , squamöz karsinoma, adenoakantoma ve müsinöz karsinoma endometrium adenokanserinden daha farklı seyretmektedirler. Bu histolojik tipler endometrium kanserinin % 40 ını oluştururlar (95, tablo XIII).

Histolojik tip	n	%
Adenokarsinoma	589	59.6
Adenoakantoma	215	21.7
Adenoskuamöz karsinoma	68	6.9
Berrak hücreli karsinom	56	5.7
Papiller adenokarsinom	46	4.7
Sekretuar karsinom	15	1.5

Tablo XIII. Endometrium kanserinde histolojik tipler (Christopherson 1982).

i- Berrak hücreli karsinom Silverberg ve Di Georgi (108) Kurman ve Scully (109) ile Christopherson'un (110) bulgularına göre adenokarsinoma göre daha belirgin olarak agresif seyretmektedir . Bu araştırmacılar 5 yıllık yaşam şansının evre I de % 44 ve tüm evrelerde % 35 olduğunu gözlemişlerdir. Ancak Crum ve Fechner (111) ile Photopoulos (112) kendi çalışmalarında berrak hücreli kanserin adenokanserden farklı seyretmediğini , önceki çalışmalarda öne sürülen kötü prognozun vakaların genellikle diferansiye olmamış tümörlerden oluşmasından ve tanı anında ileri evrede olmasından kaynaklandığını ileri sürmektedirler.

ii- Papiller seröz karsinoma ilk olarak 1982 de Hendrickson tarafından tanımlanmıştır (113). Hastalık kötü seyri ve histolojik bulgularındaki benzerlik nedeniyle papiller over kanserini andırmaktadır. Overdekinden farkı müsinöz elemanlar içermemesidir . Lenfatik yayılım ve myometrial invazyon ile ekstrapelvik yayılım adenokarsinoma göre daha sık görülür (114). Vakaların % 40 ında derin myometrial invazyon , % 37 sinde lenfatik tutulum saptanır . Vakaların yarısında cerrahi evreleme sırasında klinik evrelemeden daha yüksek evre saptanmaktadır . Evre I de hastalığın tekrarlama şansı % 50 dir (113). Evre I ve II de 5 yıllık yaşam şansı % 45 olarak verilmektedir (115).

iii- Adenoakantoma benign skuamöz metaplazinin mevcut olduğu adenokanseri ifade eder. Adenoakantomanın klinik seyrinin daha iyi olduğu iddia edilmiştir. Klinik seyir adenokansere eşlik eden skuamöz komponente değil, adenokanserin farklılaşma derecesine bağlıdır. Skuamöz komponentin mevcut olduğu adenokanserler genellikle iyi diferansiye tümörler olmakta ve tümörün grade'i esas alındığında adenoakantoma ile adenokanser arasında sürvi açısından fark bulunamamaktadır (116,117).

iv- Adenoskuamöz (adenoepidermoid karsinoma) karsinomda skuamöz komponent maligndir. Skuamöz komponentin malign olduğu tümörlerde adenokanser komponenti de az diferansiye olmaktadır. Prognozu belirleyen adenokanser komponentinin farklılaşma derecesidir (118). Yakın zamanlara kadar tümörün prognozunun kötü olduğu kabul edilmekte idi (119).

Ng ve arkadaşları 1968 de tümörün ileri yaşta görüldüğünü , semptom süresinin kısa olduğunu , tanı anında genellikle ileri evrede bulunduğunu ve glandüler elemanın daha az diferansiye olmaya eğilimi olduğunu bildirmekte ve adenoskuamöz karsinomada 5 yıllık yaşam şansını % 19 olarak vermektedir (119). Salazar ve arkadaşları ise

karşılaşılan tümörlerin % 84 ünün az diferansiye olduğunu ve grade'e göre vakalar değerlendirildiğinde prognozun adenokarsinoma, adenoakantoma ve adenoepidermoid karsinoma için aynı olduğunu bildirmekte ve adenoskuamöz karsinom için 5 yıllık yaşam şansını % 80 olarak vermektedir (118) Bu görüşü destekleyen başka yayınlar da mevcuttur (120)

v- Skuamöz karsinoma endometriunda nadiren gelişmektedir. Şimdiye kadar 18 vaka bildirilmiştir. Hastalık genellikle kronik enfeksiyonu olan kişilerde görülmektedir. Klinik seyri son derecede agresiftir (121)

vi- Müsinöz karsinoma (sekretuar karsinoma) endometriunda nadir rastlanan bir histolojik tipdir. Sekretuar aktivite gösteren iyi diferansiye endometrium adenokarsinomuna benzer. İyi seyirlidir, çoğu vaka evre I dedir, myometrial invazyon minimaldir. Sekretuar karsinoma tanısı koyulmadan önce over veya barsak kökenli bir tümörün metastazı olmadığına belirlenmesi gereklidir (110, 122)

Histolojik tip	5 yıllık yaşam
Adenokarsinom	% 79.8
Adenoakantoma	% 87.5
Adenoskuamöz karsinom	% 53.1
Papiller karsinom	% 69.7
Berrak hücreli karsinom	% 44.2

Tablo XIV. Evre I endometrium kanserinde histolojik tiplere göre 5 yıllık yaşam (Christopherson 1983).

8) Uterus büyüklüğü : Uterusun histerometri ile ölçülen kavite boyunun derecesinin hastalığın prognozunu etkileyebileceği iddia edilmiş ve büyük uterusda prognozun kötüleştiği ileri sürülmüştür (87). Ancak son yıllarda uterus büyüklüğü ile kanserin yayılması arasında kesin bir ilişki olmadığına inanılanların sayısı artmaktadır. Çünkü uterus boyutu birçok sebebe bağlı olarak değişebilmektedir ve fibromyom gibi benign nedenlerle de uterus büyüyebilir (86,99).

Uterus boyutu	n	5 yıllık yaşam
Normal	1163	1010 (% 84.5)
Büyük	576	385 (% 66.6)

Tablo XV. Uterus boyutu ile 5-yıllık yaşam şansı arasındaki ilişki (Jones HW, 1975).

9) Adneksiyal yayılma : Klinik olarak evre I olduğu düşünölen hastaların yaklaşık % 5 inde tubalarda ve % 10 unda da overlerde mikroskopik metastazlara rastlanmaktadır . Adneksiyal metastaz saptananlarda peritonda malign hücre görölme oranı % 14 den % 60 a çıkmaktadır. Adneksiyal tutulum varsa rekürens oranı % 14 den % 38 e çıkmaktadır (98). Ancak adneksiyal yayılma diğer prognostik parametrelere bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır ve bağımsız bir prognostik faktör olmadığı düşünölmektedir.

10) Hormonal reseptörler: Geçmiş yıllarda çok önemli bir prognostik parametre olduğuna inanılan östrojen ve progesteron reseptörleri düzeyi günümüzde önemini kaybetmeye başlamıştır. Östrojen ve progesteron reseptörlerinin negatif bulunmasının ve düzeyinde azalmanın prognozu kötüleştirdiği iddia edilmiştir . Çalışmalarda progesteron reseptörünün varlığı östrojen reseptörünün varlığından daha önemli görünmektedir (123,125). Ancak reseptörlerin tümör içinde heterojen dağılımı ve çalışmalarda alınan çok farklı sonuçlar bu parametrenin inanılabilirliğini azaltmıştır (126).

11) Kapiller tutulum: Evre I endometrium kanserinde % 15 oranında kapiller tutulum görölmektedir. Derin myometrial invazyon ve yüksek grade varlığında kapiller tutulum oranı artar (127). Kapiller mesafelerin tümöral hücrelerle invazyonu hastalığın rekürens oranını % 2 den % 44 e , pelvik ve paraaortik lenf ganglionu tutulumunu da sırasıyla % 19 dan % 27 ye ve % 3 den % 7 ye çıkarmaktadır (87). Kapiller tutulum bağımsız bir prognostik faktör olarak düşünölmektedir.

12) Tümör büyüklüğü: Tümörün 2 cm den daha büyük olması veya endometrium kavitesinin 1/3 ünden fazlasını kaplaması hastalığın seyrini kötüleştirmektedir. Tümör 2 cm den büyükse pelvik lenf ganglionu tutulumu % 6 dan % 21 e çıkmaktadır (106) . Multivaryant analizleri tümör büyüklüğünün bağımsız bir prognostik parametre olduğunu göstermektedir.

13) Tümör hücresinin DNA içeriği (ploidi) ve proliferatif aktivite: Yapılan DNA analizlerinde tümörde hem anöploid ve hem de öploid sayıda DNA saptanmaktadır (128-130). Tümör hücrelerinde anöploid hücre oranının artması prognozu kötüleştirmektedir . Grade I tümörlerde % 10, grade II tümörlerde % 31 ve grade III tümörlerde 78 oranında anöploidi tespit edildiği bildirilmektedir . Anöploid grupta ortalama yaşam süresi 27.5 aydan 17 aya inmektedir (131).

Tümör hücre siklusu kinetiği araştırıldığında proliferasyon fazı (S+G2 fazı) nin prognostik önemi olduğunu ileri süren çalışmalar mevcuttur (125).

DNA analizi ile alınan sonuçlar daha çok taze dokuda yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Ancak taze dokuda yapılan çalışmaların dezavantajı çalışma grubuna giren vaka sayısının az olması ve statik sitometri yöntemiyle çok daha az hücre analizinin yapılabilmesidir. Bu nedenle arşivlenmiş materyalde çalışarak vaka sayısının ve dolayısıyla çalışmanın değerinin artırılması akla yatkın görünmektedir. Biz de bu amaçla arşivlenmiş materyalde flow sitometri yöntemi ile çalıştık.

FLOW SITOMETRİ

Flowsitometri ,yüksek hızlı kompüterlerin yaşama geçirilmesi sayesinde geliştirilen kantitatif bir sitoloji yöntemidir. İlk kez 1960 yılında Herbert Derman adında bir patolog ve John Hoffer adında bir bilgisayar uzmanı tarafından sitoflorografi cihazı olarak tasarlanmıştır. Sitoflorografi cihazı Caspersson ve arkadaşlarının esaslarını belirlediği hücre çekirdeğinin floresan boyanma özellikleri göz önüne alınarak geliştirildi (132). Bu yöntemin amacı servikal kanser taramasında Papanicolaou yaymasının otomatik olarak analizini yapmaktı. Kamentsky 1963 yılında sistemi modifiye ederek , hareketsiz hücrelerin analizi yerine hareketli ortamda hücre analizi yapabilmeyi sağladı (flowsitometri) (133-135). Daha sonra da flowsitometri cihazı hücre biyolojisi ve patolojisinin incelenmesi için değişik alanlarda kullanıma girdi.

Flowsitometrinin Prensipleri

Flowsitometri lam üzerindeki hücrelerin optik özelliklerini tarayan sitofotometri ve imaj-sitometri nin tersine , çok daha hızlı olarak ve birden fazla parametrenin analizini yapma olanağını vermektedir. Dolayısıyla yöntem fazla sayıda hücrenin incelenmesini de sağlar (yaklaşık 100 kat). Temel olarak flowsitometri floresansı ölçüp kaydetme esasına dayanır. Uygun bir florokromla boyanmış ve bir eksitasyon kaynağına doğru hareket eden hücrelerin floresans dereceleri ölçülür ve dijital olarak elektronik uyarıya dönüştürülür . Eksitasyon kaynağı genellikle 450 ila 514 nm dalga boyunda monokrom ışık veren xenon-civa ya da argon laserdir. Bu ışık hücresel elemanların floresan boyaalarının maksimum absorpsiyonunu sağlar. Analiz genellikle saniyede 100-200 hücre hızıyla yapılır. Floresan ölçümler kompüterin hafızasında saklanır. Floresans yanında hücre büyüklüğü de ölçülebilir (136,137).

Flowsitometri için Materyalin Hazırlanması

Flowsitometrik analiz taze dokularda ya da saklanmış dokularda yapılabilmektedir (138).

a) Hücre süspansiyonu: İncelemede en önemli nokta incelenecek hücre popülasyonunun tek hücre süspansiyonu halinde olmasıdır. Periferik kan hücreleri, kemik iliği hücreleri ve lenfoid doku gibi hücreler arasında bağlantıların olmadığı durumlar idealdir. Ancak solid tümörlerden tek hücre süspansiyonu hazırlamak son derece zordur. Parankimal organların hücrelerini ayırmak daha kolay iken, epidermal hücreleri kuvvetli desmozomları nedeniyle ayırmak daha zordur. Hücreleri ayırmak için EDTA, pepsin, tripsin ve kollagenaz vb. proteolitik meddeler önerilmiştir ancak standart olarak uygulanan bir madde yoktur. Ayırma işleminin kendisi de hücre sitoplazmasına zararlı olabilmektedir (139-141).

b) Hücre Çekirdeğini İzole Etme Teknikleri: Solid dokulardan hücre süspansiyonu hazırlamanın zorlukları dikkate alınarak, DNA gibi hücresel elemanların analizinin de mümkün olabildiği, çekirdeğin hücreden sağlam olarak izolasyonunu sağlayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler taze dokuda ve arşivlenmiş materyalde farklıdır. (142,143)

i- Taze materyal: İlk tanımlanan çekirdek izolasyonu tekniği sitrik asit-sodyum sitrat tamponu (CASC) uygulamasıdır. Düşük pH lı bu solusyon desmozomları ve epitelyal hücrelerin sitoplazmalarını tahrip eder, ancak florlu boyaların çekirdeğe penetrasyonunu kolaylaştırır (142). Bu teknige benzeyen başka teknikler de tarif edilmiştir (144,145). Daha az hücre kaybına yol açan tekniğin uygulanması doğru olur. CASC genellikle yeterli sonucu veren bir yöntemdir.

ii- Arşivlenmiş materyal: Hedley 1983 te parafine gömülü olarak saklanmış tümör dokularından flowsitometrik DNA analizini mümkün kılan bir teknik tarif etmiştir (146-148). Bu sayede yetersiz klinik takip nedeniyle ancak küçük bir hasta grubunda yapılabilen prospektif çalışmaların yerine, klinik seyirleri bilinen vakaları irdeleyerek retrospektif olarak daha çok sayıda vakayı inceleme imkanı veren çalışmaların yapılabilmesi olanğı ortaya çıkmıştır (149). Metod 30-50 µm kalınlığında parafinize tümör dokusunun deparafinizasyonunu, proteolitik enzimlerle (tripsin, pepsin) dokudaki hücrelerin ayrılmasını, hücre

çekirdeğinin alkolle rehidrasyonunu ve florlu boylarla boyanmasını içerir. Bu yöntem farklı flowsitometri cihazlarının kullanıldığı çok sayıda laboratuvarın katıldığı çalışmalarda test edilmiş ve şaşırtıcı şekilde yakın sonuçlar elde edildiği ortaya çıkmıştır (150). ölçümler dokunun boyutu, saklanma süresi ve fiksasyon yöntemine yakından bağlıdır. Formalin dışındaki maddeler DNA proteinlerini denatüre ettiği için sadece formalinle fikse edilmiş materyaller kullanılmalıdır (147).

c) Boyama: Klinik laboratuvarlarda flowsitometri en çok lenfohematopoetik hücrelerin alt gruplamasını yapılması ve nükleik asitlerinin ölçümü için kullanılmaktadır. Ancak çalışmanın amacına göre hücrenin belli yapılarını seçici olarak boyayan boyların kullanılması ile değişik uygulamalar yapılabilmektedir (136,137). Birden fazla parametre incelenecekse birden fazla boyama da yapılabilmektedir. Ancak bu durumda boyamaların karakteristiklerinin iyi bilinmesi gerekir, çapraz floresan özellikleri olan boylar yanlış sonuçlar alınmasına yol açabilir (151-153).

DNA, RNA ya da protein gibi tek parametre ölçümleri doğrudan hücrenin o komponentinin boyanması ile sağlanır. (136,137). DNA analizi için propidium iodide, ethidium bromide ve diamidine phenylindole sık olarak kullanılmaktadır (154). Acridine orange da hem DNA yı, hem de RNA yı boyar ve aynı anda iki parametrenin de ölçümünü sağlar (155).

Herhangi bir dokuda ve herhangi bir parametre için standart bir boyama yöntemi olmamakla beraber, önerilen boyama tekniği o laboratuvarın sürekli kullandığı, yaptığı ve alışkın olduğu boyama yöntemini uygulamasıdır. A.B.D. de laboratuvarlar arasındaki ölçüm farklılıklarını ve hatta laboratuvarın kendi ölçümleri arasındaki farklılıkları değerlendirmek için National Cancer Institute mesane tümörü dokularını ve mesane yıkama sıvılarını test aracı olarak kullanmaktadır (150).

Verilerin Analizi

a) Verilerin Gösterilmesi :

Flowsitometreden üretilen veriler ya anında bir video ekranından izlenir ya da daha sonra almak üzere kompüterin hafızasına kaydedilir. Tek parametre ölçümü yapılıyorsa boyanmış hücrelerin sayısı floresan enerji fonksiyonu olarak histogramda vertikal ekseninde gösterilir. Eğer ikiden fazla

parametre ölçülüyorsa sonuçlar ölçümler arasındaki korelasyonu gösterecek şekilde aynı histogramda pikler halinde gözlenir .

DNA içeriği ploidinifadesi olarak hesaplanır ve ekranda gösterilir. Teorik olarak bir hücre popülasyonundaki DNA miktarı , kromozom sayılarına bağlı olmalıdır (diploid örnekler için 46, tetraploid örnekler için 92).

Bir hücre popülasyonundaki DNA içeriğini gösteren diğer bir gösterge de DNA indeksidir (DI). DNA indeksi histogramda elde edilen pikleri , tümörün kaynaklandığı normal dokudan elde edilen kontrol ölçümlerindeki diploid piklere göre ifade eden bir formüldür. Örneğin floresan yoğunluk skalasında kanal 70 de pik elde edilmişse ve normal diploid pikler kanal 40 da elde ediliyorsa burada DNA indeksi $70/40 = 1.75$ olacaktır.

Terim	DI
Diploid	= 1.0
Anöplid	>1.0, <1.0
Hipodiploid	< 1.0
Hiperdiploid	> 1.0
Tetraploid	= 2.0
Hipertetraploid	> 2.0
Multiploid	birden fazla anöplid

Tablo XVI. DNA indeksine (DI) göre hücedeki DNA içeriğinin adlandırılması .

Ancak normal dokudan elde edilen piklerin pozisyonu histogramda beklenen pozisyonundan % 10 kadar sapabilmektedir (84).

b) Kontroller:

Flowsitometrinin önemli konularından birisi de uygun kontrollerin kullanılmasıdır. Bilinen benign bir hücre popülasyonunun (örneğin inaktif lenfositler) diploid piklerinin kanal pozisyonunun kontrolunda kullanılabilir. Veya tavuk eritrositi gibi DNA içeriği bilinen ve sabit olan bir hücre popülasyonu , bilinmeyen hücre süspansiyonuna katılarak histogramın yorumunda referans olarak kullanılabilir.

Ancak incelenen dokuya ya da incelemenin yapıldığı kişiye yabancı kaynaklardan elde edilen ve kontrol amacıyla kullanılan hücre popülasyonları , değişkenlikler gösterebilmektedir. Bu nedenle kontrol ölçümlerinin aynı kişiye ait ve hatta aynı dokuya ait hücreler üzerinde ve aynı laboratuvar koşullarında yapılması daha doğru sonuçlar alınmasını sağlayacaktır (157).

c) Histogramın istatistik analizi:

Histogramların analizi ve ölçümlerin kalitesinin kontrolü için önerilen yöntemler varyasyon katsayısı (coefficient of variation-CV), eğim ve kurtosis dir (136,137).

Varyasyon katsayısı (VK-CV) ilk floresan pikteki ortalama kanal pozisyonunun yarı ya da tam genişliğini onun standart sapmasına bölerek elde edilir. VK bir yüzdendir ve eğrinin doğruluğunu değerlendirmede bir ölçek olarak kullanılır. Bilinen saf bir hücre popülasyonunda VK "0" dir. Ancak pratikte VK nin % 0.2-0.5 olması ideal kabul edilir. DNA ölçülen solid tümörlerde VK nin % 2-5 olması normaldir. VK nin daha yüksek olması durumunda bu örneğin heterojen olduğunu ya da hücre DNA sınırın zarar görmüş olduğunu gösterebilir ve çok yüksek VK varlığında histogramlar incelemeye alınmaz. VK nin yüksek olduğu durumda aynı pikin içindeki farklı iki hücre popülasyonunu birbirinden ayırmak mümkün olmaz. Ancak parafinize dokuda çalışırken VK genellikle daha yüksek değerlere ulaşabilmektedir (77,78).

VK nin % 3 ten yüksek olduğu durumlarda pikin çıkan ve inen kollarının simetrisi değer kazanır. Pikin eğimi (Gaus eğrisi) simetrikse bu tek hücre popülasyonunu gösterir. Eğer Gaus eğrisinin kolları asimetrikse , değerlerin birbiri üzerine bindiği ve birden fazla sayıda hücre popülasyonunun varlığı düşünülür (136,137).

Diğer bir ölçüm yöntemi kurtosistir. Bu eğrinin pik ya da düz olmasını istatistik olarak inceleyen bir yöntemdir (136,137)

Histogramdaki istatistik analizin değeri henüz tam anlaşılammıştır. Büyük serilerde istatistik verilerde büyük sapmalar görülmektedir ve bu farkların anlamı açıktır (136,137).

Hücre Siklusu Analizi

Hücre popülasyonunda DNA ölçümü hücre siklusunun bölümlerine göre 3 faza ayrılır : G1, S ve G2+M (99). Normal ancak bölünmeyen hücrelerde (G1) ve dinlenme halindeki hücrelerde (G0) DNA içeriği diploid sayıdadır (şekil 1a). S fazı DNA'nın duplikasyon fazıdır, bu fazda yavru hücreler ana hücredeki genetik materyalin bir kopyasını alırlar. G2 ve M fazı ise DNA'nın iki katına ulaştığı fazdır. Şekil 1b'deki ilk pik kullanılan standarta ait pik ve ikinci pik G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunu ve yanındaki küçük pik ise G2+M fazındaki hücreleri gösterir. Aradaki mesafede ise S fazındaki hücreler yer alır.

Acridine orange kullanarak hücre siklusu hakkında ek bilgiler alınabilir (158-161). Bu boya DNA ve RNA'ya farklı bağlanır ve DNA'ya bağlandığında yeşil, RNA'ya bağlandığında ise kırmızı floresans vererek aynı anda iki hücre komponentinin ölçülmesi olanakını verir. Eşik düzey altında RNA yapımı G1a ve eşik düzey üzerinde RNA yapımı ise G1b olarak anılır (161).

İnsan Tümörlerinde Hücre Siklusu ve DNA Ploidisi Analizi

a) DNA histogramının yorumu :

Normal dokuların aksine neoplastik lezyonlarda anöploid sayıda kromozomal sapmalar görülmektedir. Flowsitometri cihazları G1 pikinde DNA içeriği birbirinden en az % 6 farklı olan iki hücre popülasyonu olduğunu göstermektedir. Bu yöntemle karyotip anomalileri saptanamamakta ancak nümerik kromozom anomalisi tespit edilen kişilerde, DNA içeriğinin de değiştiği gözlenmektedir. Metafaz safhasında yeterli sayıda tümör hücresi bulunamadığından karyotip anomalisi ile DNA içeriği ilişkisi hakkında fazla sayıda çalışma yapılamamıştır (162,163).

İnsan tümörleri DNA dağılım paternine göre basit olarak iki gruba ayrılabilir : Anöploid ve öploid (şekil 1c). Histogramda DNA dağılımında ana pik diploid bölgede ise tümör diploiddir. Tersine ilk pik anormal bir pozisyonda elde ediliyorsa ya da birden fazla anormal pikler mevcutsa veya siklus fazlarında normal hücre siklusundaki fazlara göre beklenen oranlardan farklı hücre dağılımı mevcutsa bu tümöral hücreler nondiploid ya da anöploid dir. Normalde hücrelerin % 90 kadarı G1 pikinde yer alır. Anöploid tümörler

tek hücre popülasyonuna uyan tek tip DNA dağılımı gösterebileceği gibi, birden fazla sayıda hücre popülasyonuna uyan, birbirinden farklı DNA içeriği olan DNA dağılım paternleri de gösterebilir. G2+M fazında anormal yüksek pikler veren histogramlara da tetraploid denir. Anormal DNA pikleri veren hücre popülasyonlarında sıklıkla diploid bölgede pikler veren bir hücre popülasyonuna da rastlanmaktadır. Eğer hücre siklusu varsa birçok G2+M piki gözlenmektedir. Histogramda diploid ve anöplid tümörlerin farklı DNA içeriği ve dağılımı göstermesinin biyolojik ve klinik anlamı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (164,165). Bu konu ileride irdelenecektir.

Metod kısmen basit olmasına rağmen histogramların yorumu çok zor olabilmektedir. Diploid tümörlerde kontrol ölçümleri ile tümör dokusundaki ölçümlerin aynı DNA dağılımı ve VK nı vermesine nadir rastlanır (DNA indeksi= 1.0, VK= % 2-3). Pratikte normal dokularda bile DNA dağılımında % 10 civarında sapmalar görülebilmektedir. Örneğin bir lenfosit hücre popülasyonunda G1 pikinin kanal pozisyonu 40 iken daha sonraki ölçümlerde kanal pozisyonunun 36 ya da 44 olması normal kabul edilmelidir. Bu farkın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Boyaların DNA ya farklı bağlanması, kromatinin depolanmasında farkların olması, örneğin hazırlanması sırasındaki hatalar veya henüz bilinmeyen faktörler bu farkı yaratabilir (166).

G0/G1 pikinde normalde hücrelerin % 90 kadarının yer alması ve kalanının S ve G2+M fazında dağılması gerekir. G0/G1 pikinde % 90 dan daha az sayıda hücre varlığında yeterli yorum yapılamamaktadır ve alt limitin ne olması gerektiği konusunda da kabul edilmiş bir değer yoktur. Devonec ve Klein mesane yıkama sıvılarında G0/G1 piki alt sınırının % 85 olması gerektiğini bildirmektedir (167,168). Bu alt sınırı kendine göre belirleyen bazı çalışmacılar tümör olmayan dokularda dahi % 28-38 gibi yüksek bir oranda anormal DNA dağılımı bildirmişlerdir (169,170). Karşılaştırmalı bir çalışmada flowsitometri histogramında diploid denilen vakaların % 20 sinde imaj-sitometri yöntemiyle anöplidi tespit edilmiştir (171). Benzeri bulgular kanser efüzyonlarında da saptanmıştır (172). Dolayısıyla herhangi bir organ için normal değerler saptanmadan önce çok sayıda ölçüm yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Diploid histogramlarda eğer ikinci pikte (G2+M) hücrelerin % 5 den fazlası yer alırsa başka bir tartışma ortaya çıkmaktadır. Bu pikin anöplid bir paterni mi yoksa sadece kalıcı ya da geçici bir poliploidiyi mi gösterdiği tartışmalıdır. Ayrıca karaciğer gibi bazı normal dokularda da poliploidi normal olarak bulunmaktadır (173).

Çalışılan organa, alınan örneğe, hazırlama tekniğine, cihaza ve araştırmacının deneyimine bağlı olarak histogramın yorumu zor ya da kolay olmaktadır. Rutin flowsitometrik yöntemle çok büyük oranda benign hücreleri içeren bir hücre populasyonunda küçük miktarlardaki anöploid hücreler ölçülebilmektedir. Bu durumda direkt gözlem altında seçilmiş hücrelerde slide-sitofotometri yöntemiyle bu küçük hücre grubunu yakalamak ta mümkün olabilmektedir. Her iki teknige de sahip laboratuvarlarda DNA ölçümlerinin doğruluk oranını artırmak için iki yöntemle de ölçüm yapılması önerilmektedir (174).

b) Hücre siklusu analizi :

Hücre siklusu analizinin mantığı DNA sentezleyen hücre populasyonunu (S fazı) ölçerek tümör proliferasyonu hakkında bilgi sahibi olmaktır. S fazındaki hücreleri ölçmek ilk pikteki VK sı düşük , eğimi düşük olan iyi bir histogramda kolaydır. Ancak piklerdeki VK sı yüksek ve eğimi yüksek olan bir histogramda değerlendirme zor olmaktadır (175-177).

Histogramlarda S fazının gösterilmesinde de belirlenmiş kesin bir kriter yoktur ve bazı çalışmacılar bunu kendilerine göre değerlendirmektedirler. Analizi yapanlara göre farklı S fazı değerleri elde edilebilmektedir. Ayrıca özellikle anöploid tümörlerde siklus gösteren birçok hücre populasyonunun S fazı birbirinin üzerine binmekte ve S fazındaki hücrelerin oranlarının hesaplanması zor hatta imkansız olabilmektedir (175-177).

Diğer bir sorun da siklusa girmeyen ancak S fazında bulunan hücrelerin ölçümü konusudur. Bu hücrelere Sq denilmektedir (155-158).

Bu zorlukları dikkate almayan ve insan tümörlerinde S fazındaki hücre oranının arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (178,179). Bunun yanında son derece malign seyreden ve proliferasyon oranı ile ancak zayıf bir bağlantısı bulunan tümörlerde mevcuttur, böylece S fazı analizinin tümörün klinik seyri ile ilgisi hakkında şüpheler doğmaktadır (180-183) Bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

MATERYAL VE METOD

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde 1974-1990 yılları arasında histopatolojik tanı almış olan 358 endometriyum kanseri olgusu araştırma kapsamına alındı. Bu süre içinde herhangi bir nedenle histopatolojik inceleme yapılmış ve dokuları parafinde saklanmış olan yaklaşık 35.000 arşiv materyali tarandı. Endometriyum kanseri tanısı koyulmuş olan 358 hastaya ait, diagnostik endometriyum küretajıyla ve ameliyat yoluyla çıkarılan dokuların saklandığı parafin bloklar ayrıldı. Olguların içinden kliniğimizce tedavisi üstlenilen, histopatolojik tanısı adenokarsinoma olan ve en az 24 ay süreyle takip edilmiş olanlar seçildi. Seçilen olgulara ait bloklardan yeniden boyalı preparatlar hazırlanarak histopatolojik tanıları doğrulandı. Bu olgular içerisinden flowsitometrik DNA analizi için yeterli tümör dokusu içerdiğine kanaat getirilen 50 olgunun herbirinden en az 2 şer adet 50 mikrometre kalınlığında boyasız preparatlar hazırlandı. Boyasız preparatlarda tümör içeren kısım kırmızı işaret kalemi ile işaretlendi.

Tümör hücresi DNA sındaki heterojeniteyi dışlayabilmek için analiz tüm olgularda birden fazla sayıda preparatın ayrı ayrı incelenmesiyle yapıldı. Hastaların 34 ünde flow sitometrik inceleme ameliyatla çıkarılan tümör materyalinde yapılırken, iki olgu radikal radyoterapi ile tedavi edildikleri için bu olgularda flow sitometrik analiz sadece diagnostik küretajla elde edilen tümöral dokuda yapıldı.

Parafine gömülü dokular Hedleyin tarif ettiği metodun (146) Rüşük modifikasyonları ile flow sitometrik analize tabi tutuldu. Metod aşağıdaki etapları içermektedir:

- 1- Parafinize dokudan 50 mikron kalınlığında kesit alınarak tümör dokusu olduğunun doğrulanması
- 2- İşaretli tümöral dokunun bir bistüri yardımıyla lamel üzerinden ayrılarak tüpe yerleştirilmesi
- 3- Xylene ile en az 2 kez 10 dakika süreyle deparafinizasyon yapılması
- 4- Etanolla rehidrasyon uygulanması (önce mutlak-alkol, sonra % 99 luk etanol, daha sonra % 95 lik etanolla 10 ar dakika)
- 5- Rehydrate edilen kesitlerin fizyolojik serum içinde % 0.5 lik pepsin içeren 1 ml lik solusyonla muamele edilmesi, pH 1.5 (HCl 1N dir) iken 37 C de 60 dakika inkübasyon
- 6- Inkübasyondan sonra 1 ml PBS eklenmesi ve 1800 devirde 10 dakika santrifüj ve tekrar 1 ml PBS eklenerek 5 dakika santrifüj. Daha sonra tekrar 1 ml PBS de süspansiyon hazırlanması.

- 7- En son oluşan solusyonun 10 ml lik enjektörle naylon yumaktan filtrasyonu ve üstte kalan sıvının 5 dakika süreyle santrifüjü
- 8- Propidium iodide solusyonu ile (ml de 100 mikrogram) DNA'nın boyanması (10 mg propidium iodide 100 ml PBS de olacak şekilde) ve % 0.04 lük RNAaz ile tüpün ince bir tabaka halinde kaflanarak oda ısısında 1 saat süreyle inkübasyonu
- 9- Boyanın alınması için santrifüj ve tekrar PBS solusyonu ile süspansiyon hazırlanarak analize hazır hale getirilmesi

Flow sitometrik DNA analizi 5 W lık argon laserle donatılmış Coulter Profile Flowcytometry (Coulter electronics, Hialeah, Florida) cihazı ile yapıldı. Laser 500 mw sabit ışık çıkışı vermekteydi ve dalga boyu 488 nm idi. Floresansa karşılık pikler şeklinde histogramlar elde edildi. EC kanal pozisyonundaki pikler diploid pik ve onun dışındaki pikler anöplöid olarak kabul edildi. Her olguda en az 10.000 hücre sayılmasına dikkat edildi. DNA indeksi anöplöid hücre popülasyonunun ortalama pik kanalının, diploid hücre popülasyonunun ortalama pik kanalına oranı olarak tanımlandı. Analiz sonrasında G₀/G₁ pikinin varyasyon katsayısı (VK) % 10 un üzerinde olanlar ve her olguya ait birden fazla preparatın incelemesinde yeterli hücre sayımı elde edilemeyenler çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Analiz sırasında kontrol olarak hastanın kendisinin normal endometrium ve myometrium dokuları kullanıldı. Bu metoda göre yeterli hücre sayımı yapılabilen ve VK leri % 10 un altında olan 36 olgu çalışma grubunu oluşturdu.

Elde edilen histogramların analizi MULTICYCLE paket programı (Phoenix Flow Systems Inc., San Diego, California) yardımıyla yapıldı.

Hastalara ait klinik, ameliyat, histopatoloji ve radyoterapi kayıtları gözden geçirildi. Yaş, evre, histolojik grade, myometrial invazyon, yapılan tedavinin şekli ve hastalığın klinik seyri incelendi. Radikal radyoterapi yapılan iki olgu dışında evreleme cerrahi evreleme sistemine göre ve histolojik grade'leme FIGO nun kriterlerine göre yapıldı. Eğer diagnostik küretaj ve cerrahi olarak çıkarılan tümör materyalindeki grade değerlerdirmelerinde fark varsa, yüksek olan grade esas kabul edildi. Myometrial invazyon, tümörün myometriuma invazyon göstermediği veya myometrium 1/2 iç kısmına invaze olduğu durumda iç, myometrium 1/2 dış kısmına invaze olduğu durumda ise dış olmak üzere iki aşamada değerlendirildi. Radikal radyoterapi yapılan iki olguda evreleme klinik evreleme sistemine göre yapılırken, histolojik grade yalnızca diagnostik endometrium küretajı ile elde edilen tümöral dokuda yapıldı, myometrial invazyon ise değerlendirilemedi.

Hastalığın saptandığı an "0" anı kabul edilmek üzere çizilen Kaplan-Maier eğrilerinin istatistik analizinde "log rank" metodu kullanıldı. Yaş, evre, grade, myometrial invazyon ile anöploidi ilişkisinin araştırılmasında Fisher exact testi, aynı parametrelerle proliferasyon fazı ortalamalarının karşılaştırılmasında varyans analizi kullanıldı. S fazı diskriminant analizinde ve gözlerin frekansların karşılaştırılmasında ki-kare ile Fisher exact testi, S fazı ve DNA indeksi ortalamalarının diğer parametrelerle karşılaştırılmasında varyans analizi uygulandı.

BULGULAR

Flow sitometrik DNA analizine alınan 50 olgu içinde 36 olguda yeterli hücre sayısı (her analiz başına 10 bin hücreden fazla) ve yeterli VK (6.98, sd 2.06) elde edildi. Elde edilen sonuçlar tablo XVII de toplu olarak görülmektedir.

KLİNİK ÖZELLİKLER : Tüm olgularda ortalama yaş 57.1 (sd 9.84) olarak bulundu. Anöplöid olgularda yaş ortalaması 62.3 (sd 11.5), diploid olgularda ise 55.6 (sd 8.9) idi ve fark istatistik anlam göstermiyordu ($p>0.05$, $t=1.7$). Ortalama hasta takip süresi 51.91 (sd 24.6) ay idi. Anöplöid olgularda ortalama hasta takip süresi 48.37 (sd 32.57) ay olurken, diploid olgularda ortalama hasta takip süresi 52.92 ay idi ve takip süreleri açısından gruplar arasında fark görülmedi ($p>0.05$, $t=0.45$).

Minimum 24 ay takip edilen (24-109 ay) 36 olgudan 7 tanesinde takip süresi içinde klinik olarak saptanan rekürens görüldü. Rekürenslerin 6 tanesi abdominal hastalık, 1 tanesi paraaortik lenfadenomegali şeklinde ortaya çıkarken, pelvik rekürens rastlanmadı. Rekürenslerin ortaya çıkma süresi ortalama 31.7 ay idi. Rekürensler anöplöid tümörlerde ortalama 37 ayda ortaya çıkarken, diploid tümörlerde ortalama 27.7 ayda ortaya çıktı, ancak bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$, $t=0.5$). Görülen 7 rekürens 6 tanesinde rekürens süresi, tüm olgulardaki ortalama takip süresinin altında idi, bir olguda ise hastalık 62. ayda tekrarladı. Hastalık rekürenslerinin 5 tanesi evre III, 1 tanesi evre II ve 1 tanesi de evre I endometrium kanseri olan olgularda görüldü.

Olguların 20 sinde preoperatif radyoterapi yapılırken, 8 hastada postoperatif radyoterapi uygulanmıştı. 3 hastada sadece TAH+BSO yapılmış, 2 hastada historektomiye selektif pelvik lenfadenektomi eklenmişti. 2 hasta ise radikal radyoterapi ile tedavi edilmişlerdi. 1 hastada postoperatif kemoterapi uygulanmıştı. Preoperatif radyoterapinin uygulanan ve uygulanmayan hastalarda anöplöidi, proliferasyon fazı, DNA indeksi, evre, grade, myometrial invazyon ve yaş açısından gruplar arasında fark görülmedi (Tablo XXVII ve XXVIII).

ANÖPLOİDİ : Histogramda diploid pik yanında ikinci bir pikin varlığı olarak tanımlandığında 36 olgunun 8 inde anöplöidi saptandı (% 22.2). 60 yaş üzerindeki olgularda anöplöidi oranının 3.75 kat arttığı ve bunun sınırdan anlam taşıdığı gözlemlendi ($p=0.58$, tablo XVIII). Evre III olan olgularda evre I ve II ye göre anöplöidi oranının 2.5 kat arttığı ancak bu artışın istatistik anlamı olmadığı görüldü ($p>0.05$, tablo

XIX). Grade II ve III tümörlerde anöploidi oranının, grade I tümörlere oranla 2.2 kat azalma gösterdiği; ancak burada da anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$, tablo XX). Myometrial invazyon derinliğinin ise anöploidi oranını değiştirmedığı görüldü ($p > 0.05$, tablo XXI). Anöploid ve diploid olguların Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri karşılaştırıldığında, anöploid olgularda hastalıksız yaşam olasılıkları daha düşük olmakla beraber bu fark istatistik anlam vermemekte idi. ($p = 0.12$, tablo XXVI, şekil III).

PROLİFERASYON FAZI : Proliferasyon fazı değerleri Multicycle paket programı yardımıyla şekil I de tanımlandığı biçimde ölçüldüğünde, tümör hücresinin proliferasyon fazı değerlerinin, hastalığın klinik seyrini önemli oranda etkilediği görülmektedir. En az 48 ay süreyle takip edilmiş 21 diploid olguda hastalığın tekrarlaması açısından diskriminant analizi yapıldığında, elde edilen kritik S değerleri tablo XXII de gösterilmiştir. Tabloda görülen % 9 ve % 20 değerleri ayrı ayrı, S fazı için cut-off değerleri olarak kabul edildiğinde ve ayrıca diploid grup üç alt gruba ayrılarak incelendiğinde, proliferasyon fazının her basamakta ileri derecede prognostik değer taşıdığı gözlenmektedir (Tablo XXVI, şekil IV, V, VII).

Anöploid tümörlerde S fazı değerlerinin diploid olgulara göre oldukça yüksek (32.5, sd 26.9 ve 11.0, sd 10.5) düzeyleri çıktığı ve arasındaki farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.01$, $t = 3.4$). Ancak histogramların paket programlarla kompüterize analizinde, anöploid popülasyona ait G1 pikinin, diploid popülasyonun S fazı ile üst üste binmesi nedeniyle, anöploid tümörlerde diploid popülasyonun S fazının doğru değerlendirilmesi her zaman mümkün olamamaktadır. Histogramda görülebilir bir G1 piki oluşturmamış anöploid bir hücre popülasyonu, kendisini diploid hücre popülasyonunun S fazında artış şeklinde de ortaya koyabilir. Diploid hücre popülasyonunun S fazındaki artışın hücre sayısı fazla olmayan bir anöploid popülasyondan kaynaklandığı farz edilirse, anöploid hücrelerin G1 pikine düşen hücre sayısını diploid hücrelerin S fazına katarak yapılan bir değerlendirme de akla yatkın olacaktır. Bu durumda anöploid tümörlerde:

"Diploid hücre pop. S fazı + Anöploid hücre pop. G1 piki" formülünden, tablo XVIIb deki verilerden hesaplanan düzeltilmiş S fazı değerleri içinde en düşük değer % 26.1 ile olgu G.E. ye aittir. Tablodan elde edilen diğer olgulara ait değerler; NS > % 79.0, VK > 62.8, MB > % 35.1, MT > % 36.9, FS > % 55.4, BD > % 28, HG > % 29 dur. Dolayısıyla anöploid olguları S fazı 26 dan büyük olan diploid olgular gibi kabul edebiliriz. Bu kabule dayanarak ve S fazı cut-off değerini % 25 alarak yapılan istatistik analizde, takip süresinden

bağımsız olarak hastalığın tekrarlama oranının, 5 fazı % 25 in altında olanlarda anlamlı olarak düşük olduğu ($p=0.018$, Tablo XXIII) ve bu iki grupta elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrilerinin karşılaştırılmasında ileri derecede anlam taşıyan bir fark doğurduğu görülmektedir ($p=0.0004$, tablo XXVI, şekil VI).

Proliferasyon fazının 60 yaş üzerinde anlamlı oranda artış gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$, $t=2.2$, tablo XVIII). Evre, grade ve myometrial invazyon derinliğine göre proliferasyon fazında değişiklik olmadığı görüldü (Tablo XIX-XXI).

DNA İNDEKSİ : DNA indeksi (DI), anöloid pikin gözlenen ortalama G1 değerinin, diploid pikin ortalama G1 değerine oranı olarak kabul edildiğinde, diploid olguların tümünde DI 1.00 iken, anöloid olguların 5 tanesinde DI 1.4 ün üzerinde ve 3 tanesinde de 1.4 ün altında olmuştur. (olgunun 7 sinde DI 1.00-2.00 arasında yer alırken 1 olguda DI 2.746 (hipertetraploid) bulunmuştur. Tüm olgular DI=1.00, 1.1-1.4 ve 1.4 den büyük olanlar olarak ayrıldığında, DI nin 1.4 ün üstünde olduğu olgularda hastalığın daha kötü seyrettiği ve DI nin prognostik değer taşıdığı görülmektedir ($p=0.036$, tablo XXVI, şekil VIII). DNA indeksi evre ve myometrial invazyon derinliğinin artmasıyla birlikte artmakta, grade'in artışı ile birlikte azalmaktadır, ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo XXIV-XXV). 60 yaş üzerinde DNA indeksinin anlamlı olarak 1.4 ün üzerinde olduğu görülmektedir (Tablo XXIV).

EVRE : 36 olgunun 22 si (% 61) evre I, 7 si evre II (% 19) ve 7 si evre III de (% 19) bulunmuştur. Evrelere göre elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrilerinin karşılaştırılmasında, evrenin ileri derecede istatistik anlam veren prognostik bir değişken olduğu görülmüştür ($p<0.00001$, tablo XXVI, şekil IX).

GRADE : 36 olgunun 20 si grade I (% 55.5), 15 i grade II (41.6) ve 1 tanesi grade III (% 2.7) bulunmuştur. Grade I e karşı grade II+III de elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrilerinin karşılaştırılmasında, grade'in prognostik değerinin olmadığı görülmüştür (Tablo XXVI, şekil X).

MYOMETRIAL İNVAZYON : 36 olgunun 6 sında (% 16.6) myometrial invazyon görülmezken, 11 (% 30.5) tanesinde myometrium 1/2 iç kısmına ulaşan invazyon ve 17 (47.2) tanesinde myometrium dış kısmına ulaşan invazyon görülmüştür. İki olguda (% 5.5) cerrahi tedavi yapılmadığı için myometrial invazyon derinliği bilinmemekteydi. 34 olgu myometrium 1/2 iç kısmına kadar invazyon yapanlar ($n=17$, % 50) ve myometrium 1/2 dış kısmına

ulaşan invazyon yapanlar (n=17, % 50) olmak üzere iki gruba ayrıldığında , elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam egrilerinin karşılaştırılmasında , myometrial invazyon derinliğinin prognostik değeri olmadığı görülmektedir (Tablo XXVI, Şekil XI).

YAŞ : 36 olgunun 20 sinin (% 55.5) 60 yaş uzerinde ve 16 sinin (% 44.4) 60 yaş altında olduğu görüldü. 60 yaşın uzerindeki olgularda anöploidi oranının arttığı ve proliferasyon fazının anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir (Tablo XVIII). DNA indeksi de 60 yaş uzerinde anlamlı artış göstermektedir (p=0.011, Tablo XXIV). Ancak yaş gruplarına göre elde edilen Kaplan-Meier egrilerinin karşılaştırılmasında yaşın prognostik bir parametre olmadığı görülmektedir (Tablo XXVI) .

Yaş	Evre	Grade	M. I.	Tedavi	Prognoz	G1	CV-G1 (%)	X-G1	G2	CV-G2 (%)	X-G2	G2/G1	D. I.
66	II	I	dış	TAH+BSD+Lenf.	72 ay HBY	22.7	8.3	75.1	45.6	5.1	24.9	2.009	1.00
55	I	I	iç	TAH+BSD+Pr. RT	96 ay HBY	62.8	9.8	96.4	110.1	11.0	0.0	1.777	1.00
54	I	I	dış	TAH+BSD+Pr. RT	24 ay HBY	27.1	6.5	82.9	57.6	7.5	16.5	2.129	1.00
55	II	II	---	TAH+BSD+Pr. RT	48 ay HBY	31.4	9.1	93.4	62.2	17.0	2.1	1.982	1.00
64	I	II	iç	TAH+BSD+Pr. RT	67 ay HBY	18.0	5.3	98.4	42.2	0.3	1.6	2.239	1.00
51	I	I	---	TAH+BSD+Po. RT	72 ay HBY	21.6	8.7	98.3	48.8	8.7	1.7	1.888	1.00
47	II	I	dış	TAH+BSD+Pr. RT	44 ay HBY	15.5	5.8	96.1	29.9	5.8	2.2	1.927	1.00
41	I	I	dış	TAH+BSD+Pr. RT	27 ay HBY	18.4	4.8	95.1	35.5	4.9	3.6	1.933	1.00
48	I	I	iç	TAH+BSD+Pr. RT	75 ay HBY	23.9	5.0	99.0	46.4	2.5	0.0	1.943	1.00
61	I	II	dış	TAH+BSD+Po. RT	96 ay HBY	22.0	7.6	91.9	42.3	7.7	1.6	1.925	1.00
50	I	I	dış	TAH+BSD	41 ay HBY	17.5	6.0	93.7	33.0	3.5	5.7	1.886	1.00
50	I	II	dış	TAH+BSD+Lenf.	82 ay HBY	19.9	6.9	85.0	39.6	2.8	12.0	1.990	1.00
48	I	I	iç	TAH+BSD+Pr. RT	51 ay HBY	35.6	9.9	88.5	67.8	11.3	2.0	1.903	1.00
70	I	II	dış	TAH+BSD+Pr. RT	63 ay HBY	17.4	1.9	63.5	32.6	2.1	34.4	1.879	1.00
58	II	II	dış	TAH+BSD+Pr. RT	24 ay HBY	18.9	4.7	83.9	37.1	2.8	13.2	1.969	1.00
56	III	II	dış	TAH+BSD+Po. RT	16 ay hasta	23.8	9.5	72.9	47.1	11.5	25.7	1.980	1.00
50	I	II	---	TAH+BSD+Po. RT	30 ay HBY	24.7	5.0	82.8	48.5	5.0	14.1	1.965	1.00
62	I	I	iç	TAH+BSD+Pr. RT	70 ay HBY	25.4	7.0	94.1	48.9	7.0	5.9	1.925	1.00
65	II	I	?	Radikal RT	54 ay HBY	22.7	5.7	95.5	43.9	5.6	3.1	1.934	1.00
50	II	II	iç	TAH+BSD	66 ay HBY	18.3	8.1	92.0	20.0	3.1	7.0	1.980	1.00
66	I	II	dış	TAH+BSD+Pr. RT	63 ay HBY	18.4	6.6	80.2	36.6	6.6	19.8	1.992	1.00
48	I	I	---	TAH+BSD+Pr. RT	54 ay HBY	22.9	4.5	95.7	48.6	4.5	4.0	2.130	1.00
75	I	II	dış	TAH+BSD+Pr. RT	55 ay HBY	21.9	4.7	94.2	45.7	4.7	5.1	2.090	1.00
56	I	II	iç	TAH+BSD+Po. RT	48 ay hasta	23.4	6.1	90.7	54.9	6.1	9.1	2.340	1.00

46	III	I	dış	TAH+BSD+Po.RT	52 ay HBY	23.8	7.6	81.9	50.1	7.6	15.2	2.110	1.00
38	I	I	iç	TAH+BSD	45 ay HBY	18.9	3.2	78.5	35.9	3.1	16.7	1.899	1.00
65	III	I	iç	TAH+BSD+KT	5 ay hasta	25.8	9.4	67.1	50.8	9.3	32.9	1.972	1.00
62	III	II	dış	TAH+BSD+Po.RT	42 ay hasta	20.8	7.7	69.2	44.5	6.2	30.8	2.138	1.00

o XVIIa. Olgularda DNA analizi bulguları: Diploidi gözlenen olgular

: Myometrial invazyon

BSD: Total abdominal Histerektomi

: Selektif pelvik lenfadenektomi

t: Preoperatif radyoterapi

t: Postoperatif radyoterapi

Kimoterapi

Klinik olarak hastalık belirtisi yok

Myometrial invazyon yok

Myometrium 1/2 iç kısmında tümöral invazyon var

Myometrium 1/2 dış kısmında tümöral invazyon var

G0/G1 pikinin ortalama kanal değeri

Varyasyon katsayısı:

: G1 pikine düşen hücrelerin sayısının toplam popülasyondaki hücrelerin sayısına oranı

G2/M pikinin ortalama kanal değeri:

Sentez fazındaki hücrelerin sayısının toplam popülasyondaki hücrelerin sayısına oranı

: G2 pikinin ortalama kanal değerinin G1 pikinin ortalama kanal değerine oranı

: DNA indeksi (Anöplid hücre popülasyonunun G1 pikinin ortalama kanal değerinin diploid hücre popülasyonunun ortalama kanal değerine oranı)

Yaş	Evre	Grade	M.İ.	Tedavi	Prognoz	G1	CV-G1	%-G1	G2	CV-G2	%-G	G2/G1	%-Total	D.İ.
65	II	I	iç	TAH+BSD+Pr.RT	62 ay hasta	34.9	9.3	20.2	69.3	12.1	79.0	1.987	29.4	
						52.2	9.2						70.6	1.497
68	III	I	dış	TAH+BSD+Pr.RT	9 ay hasta	9.8	8.1	37.2	19.5	8.1	62.8	1.980	46.3	
						27.0	8.1	74.8	53.7	8.1	22.9	1.990	53.7	2.746
65	I	I	dış	TAH+BSD+Pr.RT	76 ay HBY	22.4	9.8	88.2	42.3	13.8	8.8	1.890	81.0	
						33.2	9.0	76.6	69.4	13.7	8.9	2.091	19.0	1.500
64	III	I	dış	TAH+BSD+Pr.RT	25 ay HBY	16.0	9.2	100.0	31.8	12.2	0.0	1.983	60.9	
						23.3	9.3	71.8	46.9	12.3	24.1	2.000	39.1	1.454
80	III	III	?	Radikal RT	40 ay hasta	26.6	5.2	81.4	55.8	5.2	18.6	2.102	81.4	
						39.4	8.1	74.7	71.1	8.1	12.9	1.804	18.6	1.483
63	I	II	---	TAH+BSD+Pr.RT	42 ay HBY	28.5	6.5	64.9	44.2	6.5	35.1	2.011		
						23.6	6.6	48.0	53.4	6.6	41.8	2.261	8.9	1.153
40	I	I	iç	TAH+BSD+Pr.RT	109 ay HBY	20.5	9.4	80.4	45.8	9.4	18.9	2.235	54.9	
						27.0	7.1						45.1	1.318
54	I	II	---	TAH+BSD+Po.RT	24 ay HBY	18.3	8.7	60.9	36.3	8.8	36.9	1.980	69.2	
						25.2	9.5	81.7	55.0	14.5	0.00	2.185	30.0	1.375

XVIIb. Olgularda DNA analizi bulguları: Anöplöidi gözlenen olgular

al: Diploid veya anöplöid hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı

Yaş	Anöploid		% S fazı fraksiyonu (ortalama + SD)
	No	%	
< 60	2/20	10.0	10.33 + 9.6
> 60	6/16	37.5	22.77 + 22.8
p=0.058 (Fisher exact)			p<0.05 (t=2.2)

Tablo XVIII. Yaş ile anöploidi ve S fazı fraksiyonu arasındaki ilişki

Evre	Anöplöid		% S fazı fraksiyonu	
	No	%	(ortalama ± SD)	
I	4/22	18	11.4 ± 11.5	(t1=0.97)
II	1/7	14	18.7 ± 27.7	(t2=2.02)
III	3/7	43	26.5 ± 19.4	(t3=0.84)
p)0.05 (X2=0.77)			p)0.05	

Tablo XIX. Evre ile anöplöidi ve S fazı fraksiyonu arasındaki ilişki

Grade	Anöplöid		% S fazı fraksiyonu (ortalama + SD)	Yalnız diploid grupta % S fazı fraksiyonu (ortalama + SD)
	No	%		
I	5/20	40	15.19 + 21.2	8.96 + 9.9
II-III	3/16	18	16.69 + 12.5	13.57 + 11.0
p=0.48 (Fisher exact)			p)0.05 (t=0.2)	p)0.05 (t=1.15)

Tablo XX : Grade ile anöplöidi ve S fazı fraksiyonu arasındaki ilişki

M. I.	Anöploid		% S_fazı fraksiyonu (ortalama + SD)
	No	%	
<1/2	4/17	24	15.7 + 20.5
>1/2	3/17	18	16.5 + 15.8
p)0.05 (Fisher exact)			p)0.05 (t=0.14)

Tablo XXI. Myometrial invazyon ile anöploidi ve S_fazı fraksiyonu arasındaki ilişki

Sınır değeri (%)	p
7	0.035
9	0.021
20	0.027
25	0.011

Tablo XXII. En az 48 ay süreyle takip edilmiş 21 diploid olguda relaps açısından S fazı değerlerine göre diskriminant analizi

S fazı (%)	Relaps		Hastaliksız		P
	n	%	n	%	
< 25	2	8.0	23	92.0	0.018
> 25+ Anöploidi	5	45.4	6	54.6	

Tablo XXIII. Takip süresinden bağımsız olarak S fazı cut-off değeri 25 seçildiğinde relaps riski.

Değişken	DI > 1.4		p
	n	%	
Evre			
I	1/22	4.5	> 0.05 (X ² =3.97)
II	1/7	14.2	
III	3/7	42.8	
Grade			0.24
I	4/20	20.0	(Fisher exact)
II+III	1/16	6.2	
Myometrial invazyon			0.30
1/2 iç	1/17	5.8	(Fisher exact)
1/2 dış	1/17	17.6	
Yaş			0.011
< 60	0/20	0.0	(Fisher exact)
> 60	5/16	31.2	

Tablo XXIV. DNA indeksi ile evre, grade, myometrial invazyon ve yaş ilişkisi

Değişken	n	DNA indeksi (ortalama, sd)	p
Evre			> 0.05
I	22	1.06 + 0.14	
II+III	14	1.22 + 0.47	
Grade			> 0.05
I	20	1.17 + 0.41	
II+III	16	1.06 + 0.14	
Myometrial invazyon			> 0.05
1/2 iç	17	1.07 + 0.15	
1/2 dış	17	1.15 + 0.43	
Yaş			> 0.05
< 60	20	1.03 + 0.10	
> 60	16	1.23 + 0.45	

Tablo XXV. DNA indeksi ile evre, grade, myometrial invazyon ve yaş ilişkisi (Fisher exact test).

parametre	log-rank X ²	p degeri
Yaş	1.72	0.1885
< 60		
> 60		
Evre	27.13	< 0.00001 *
I		
II		
III		
S fazı (%)		
Diploid grup	12.27	0.0022 *
< % 9		
% 9 < S < % 20		
> % 20		
< % 9, > = % 9	5.79	0.0161 *
< % 20, > = % 20	11.84	0.0006 *
< % 25, > = %25+Anöplöidi	12.33	0.0004 *
DNA indeksi	6.63	0.0362 *
DI < 1.4		
DI > = 1.4		
Ploidi	2.44	0.1182
Anöplöidi		
Diploidi		
Grade	0.45	0.5001
I		
II+III		
Myometrial invazyon	0.38	0.5357
1/2 iç		
1/2 dış		

Tablo XXVI. Endometrium kanserinde prognostik faktörlerin tek değişkenli analizi (log-rank test)

* istatistik olarak anlamlı

Preoperatif RT	n	Anöploidı	% S Fazı ortalama+SD	DNA indeksi ortalama+SD
Uygulanan	20	6 (% 30.0)	7.88+ 9.83	1.18+0.40
Uygulanmayan	16	2 (% 12.5)	14.32+10.64	1.05+0.14
		p= 0.19 (Fisher exact)	P) 0.05 (t:1.66)	p) 0.05 (t:1.19)

Tablo XXVII . Preoperatif radyoterapi uygulanan ve uygulanmayan olgularda DNA parametrelerinin karşılaştırılması

Preoperatif RT	n	Evre			Grade		My. inv.		Yaş	
		I	II	III	I	II+III	İç	Dış	< 60	> 60
Uygulanan	20	14	4	2	13	7	10	10	10	10
Uygulanmayan	16	8	3	5	7	9	7	7	10	6
		P > 0.05			P > 0.05		p > 0.05		p > 0.05	
	X ² :	1.50			2.66		1.05		1.33	

Tablo XXVIII. Preoperatif radyoterapi uygulanan ve uygulanmayan olgularda evre, grade, myometrial invazyon derinliği ve yaş dağılımı.

Parametre	Hasta	Hastaliksız	p değeri
Anöplöidi	3/7 (% 42.8)	5/29 (% 17.2)	0.96
S-fazı			
tüm grup	36.98 + 24.93	10.76 + 10.96	< 0.001 *
diploid grup	24.62 + 10.78	8.84 + 8.8	< 0.01 *
DNA indeksi	1.38 + 0.63	1.06 + 0.14	< 0.02 *
Evre			0.0083 *
I	1/7 (% 14.2)	21/29 (% 72.4)	
II+III	6/7 (% 85.7)	8/29 (% 27.5)	
Grade			0.36
I	3/7 (% 42.8)	17/29 (% 58.6)	
II+III	4/7 (% 57.1)	12/29 (% 41.3)	
My. Inv.			0.67
1/2 iç	3/6 (% 50)	14/28 (% 50)	
1/2 dış	3/6 (% 50)	14/28 (% 50)	
Yaş			0.11
< 60	2/7 (% 28.5)	18/29 (62.0)	
> 60	5/7 (% 71.4)	11/29 (37.9)	

Tablo XXIX. Rekürens görülen ve görülmeyen olguların DNA, evre, grade, myometrial invazyon derinliği ve yaş özellikleri (p değerleri X2 testi ile hesaplanmıştır)
My.inv: Myometrial invazyon
* istatistik olarak anlamlı

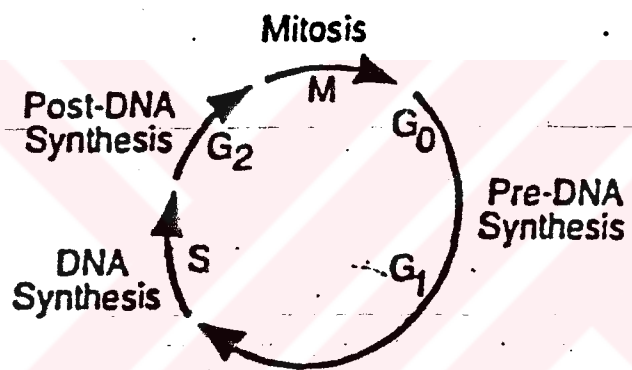
Çalışmacı	Yıl	N	Yorum
Naus	1985	19	DNA indeksi prognozu yansıtır
Quillamor	1988	60	Grade'i yüksek tümörlerde anöploidi prognostiktir
Rosenberg	1989	111	DNA indeksi ve S fazı prognostiktir
van der Putten	1989	33	DNA indeksi ve anöploidi prognostiktir
Newburry	1990	233	DNA indeksi prognostiktir
Konski	1991	20	Anöploidi ve S fazı sürviyi kötüleştirir (*)
Takahashi	1991	54	S fazı ve proliferasyon indeksi ileri evrede prognostiktir

Tablo XXVII . Endometrium Kanserinde Parafinize Dokuda Flow Sitometrik DNA Analizi Çalışmaları

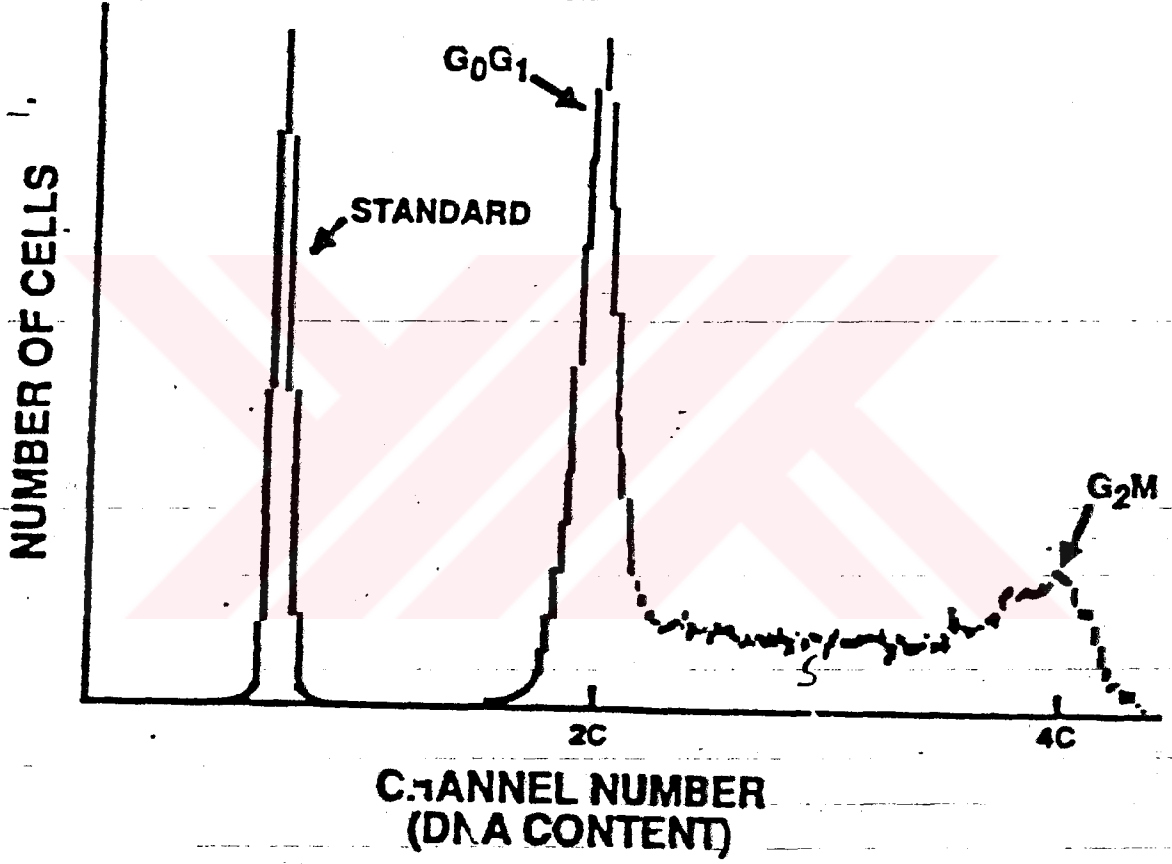
* Bu çalışmada sürvi daha kötü olmakla beraber istatistik anlam bulunmamıştır.

Çalışmacı	Yıl	N	Yorum
Geisinger	1986	21	Proliferatif indeks, S fazı ve DNA indeksi prognostiktir
Iversen	1986	52	DNA indeksi prognostiktir
Lindahl	1987	110	Anöploidi ve DNA indeksi prognostiktir
Symonds	1990	67	DNA indeksi ve anöploidi prognostiktir

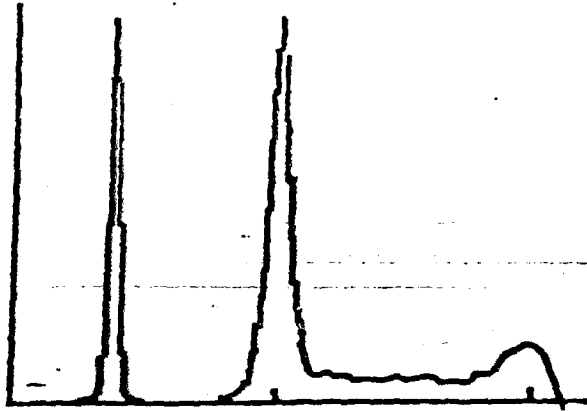
Tablo XXXI. Endometrium kanserinde taze preparatta flow sitometrik DNA analizi çalışmaları.



Definin: Iain-Normal hücre döngüsü



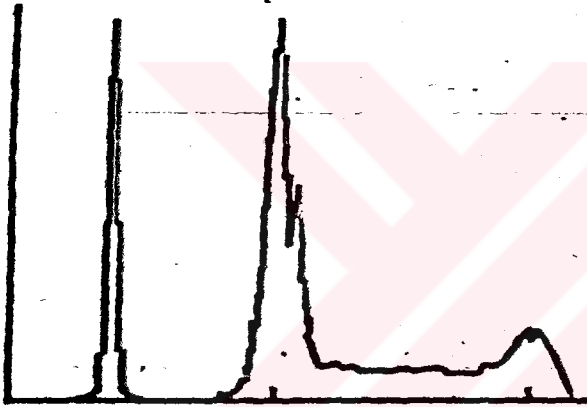
Şekil 1b . Standart hücre popülasyonuna karşı diploid hücre popülasyonu ve fazları



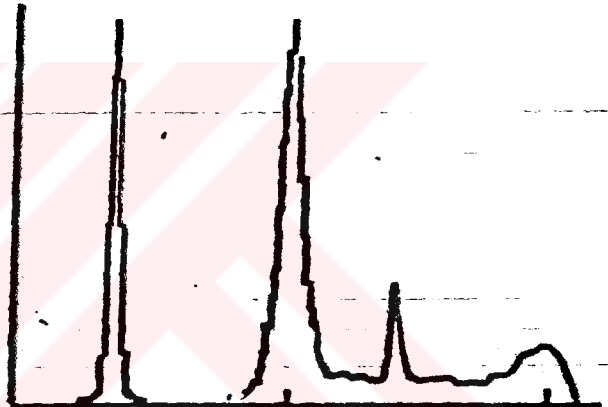
NORMAL



PROLIFERATIVE



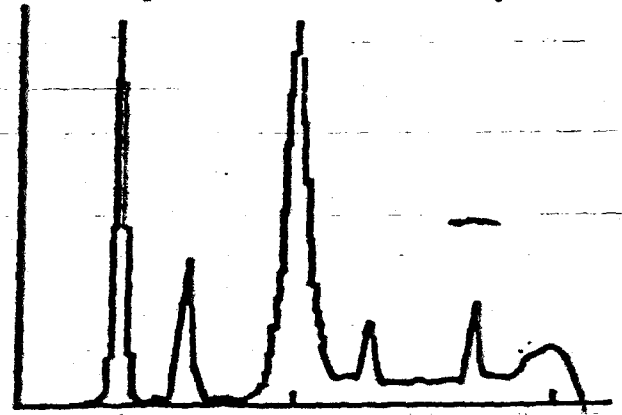
**ANEUPLOID
(NEAR DIPLOID)**



**ANEUPLOID
(HYPERDIPLOID)**



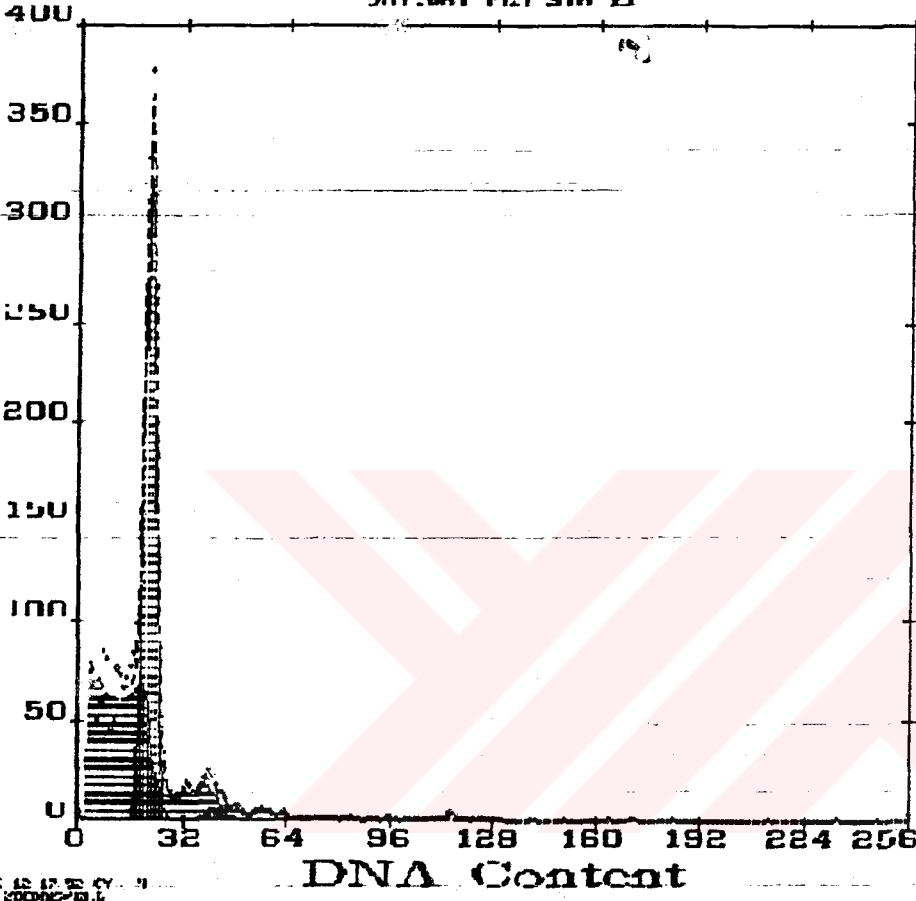
**ANEUPLOID
(HYPODIPLOID)**



MULTIPLOID

Şil. 1c. Normal ve anöploid hücre-populasyonları

961.DAT FILE 31A II

CELL CYCLE
DATA

Mean G1 = 22.4

CV G1 = 7.6

% G1 = 91.9

Mean G2 = 42.3

CV G2 = 7.7

% G2 = 3.5

% S = 1.6

G2/G1 = 1.925

% Clump = 9.1

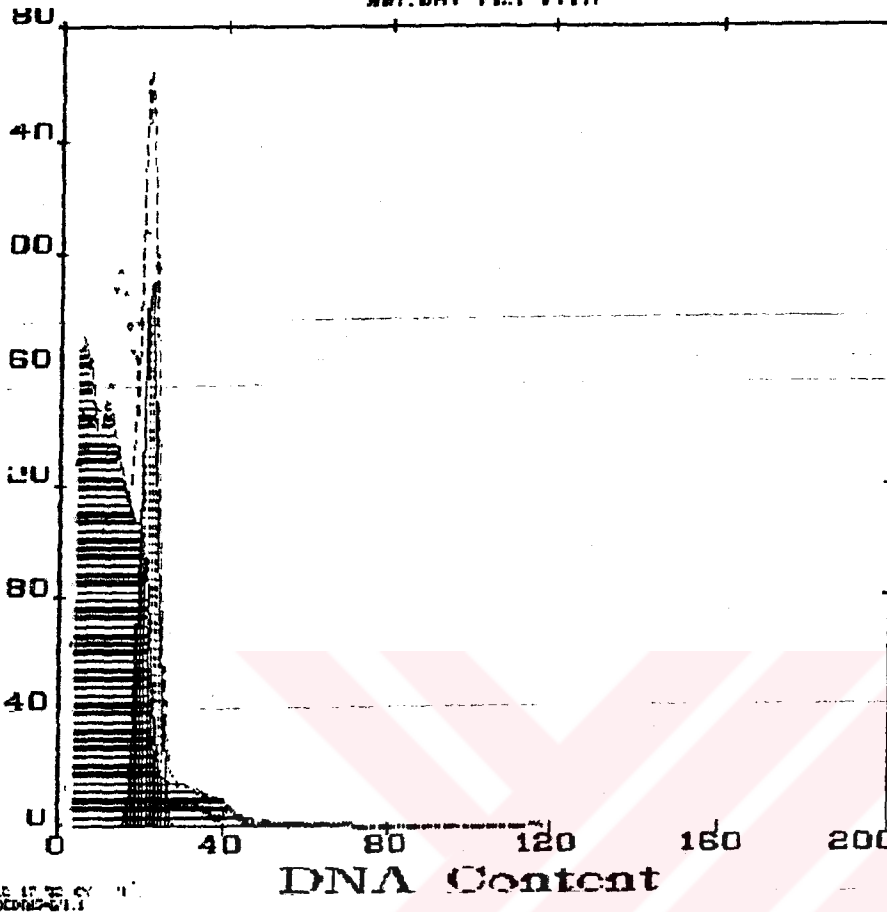
Chi Sq. = .2

DNA Content

Şekil-11a. Çekirdek kırıntılıarı (debris) ile hafız kırılanma gösteren diploid populyasyona ait histogram

WA.DAT FL7 117A

CELL CYCLE
DATA



Mean G1= 21.6

CV G1 = 8.7

% G1 = 98.3

Mean G2 48.8

CV G2 = 8.7

% G2 = .0

% S = 1.7

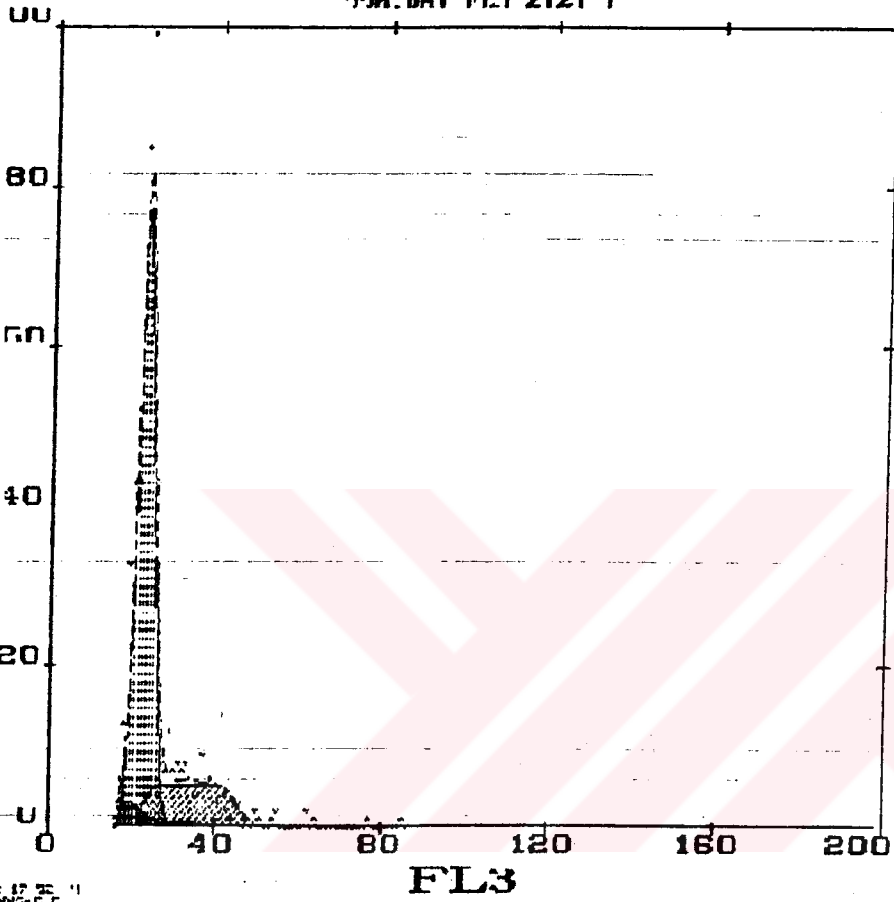
G2/G1 1.888

% Clump= 10.0

Chi Sq. = 1.3

Şekil IIb. Çekirdek kırıntıları (debris) ile yoğun kirlenme gösteren diploid popülasyona ait histogram

00A.DAT FL3 2121 1



CELL CYCLE
DATA

Mean G1 = 22.7

CV G1 = 8.3

% G1 = 75.1

Mean G2 = 45.6

CV G2 = 5.1

% G2 = .0

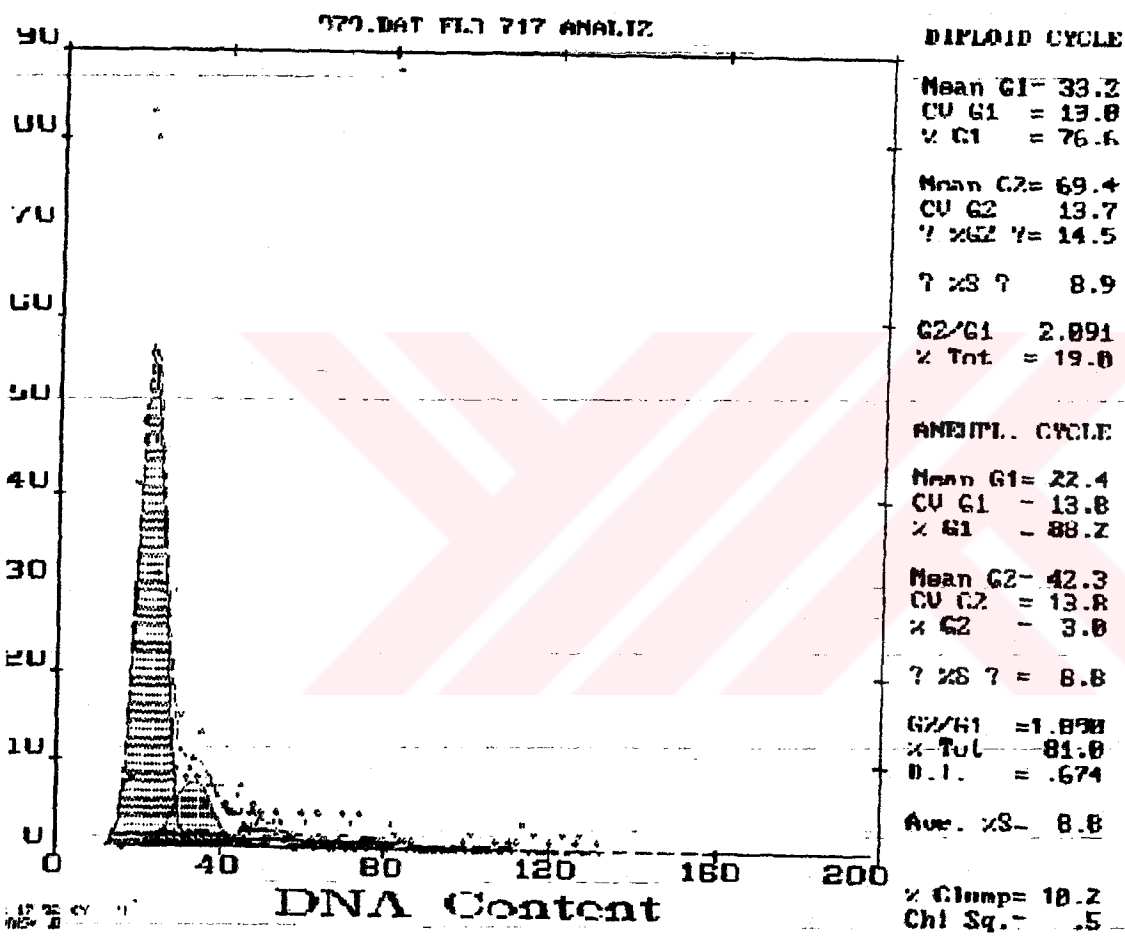
% S = 24.9

G2/G1 = 2.009

% Clump = .0

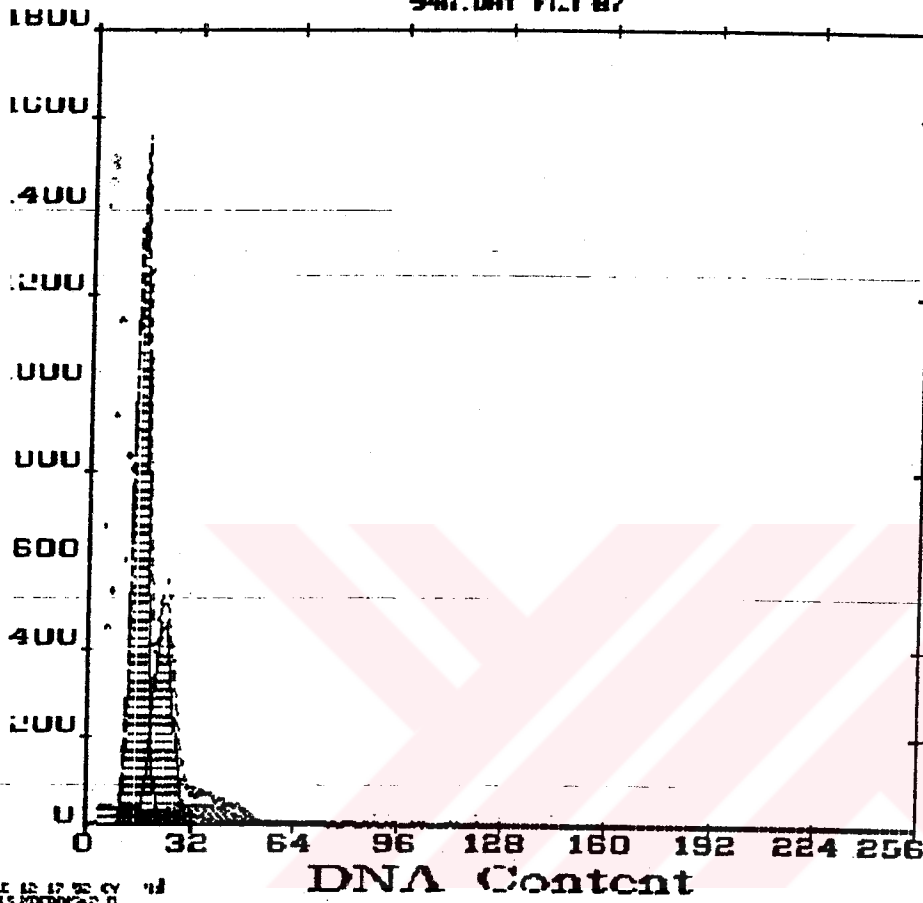
Chi Sq. = .2

Şekil IIc. S fazı yüksek diploid popülasyona ait histogram



Sekil IId. Yakın-diploid pik gösteren anöploid histogram

946.DAT FILE 87



DIPLOID CYCLE

Mean G1= 16.0
CV G1 = 12.2
% G1 = 100.0

Mean G2= 31.1
CV G2 = 12.2
% G2 = 0

? %S ? = 0

G2/G1 = 1.983
% Tot = 60.9

ANEUPLOID CYCLE

Mean G1= 23.3
CV G1 = 12.3
% G1 = 71.8

Mean G2= 46.9
CV G2 = 12.3
% G2 = 4.1

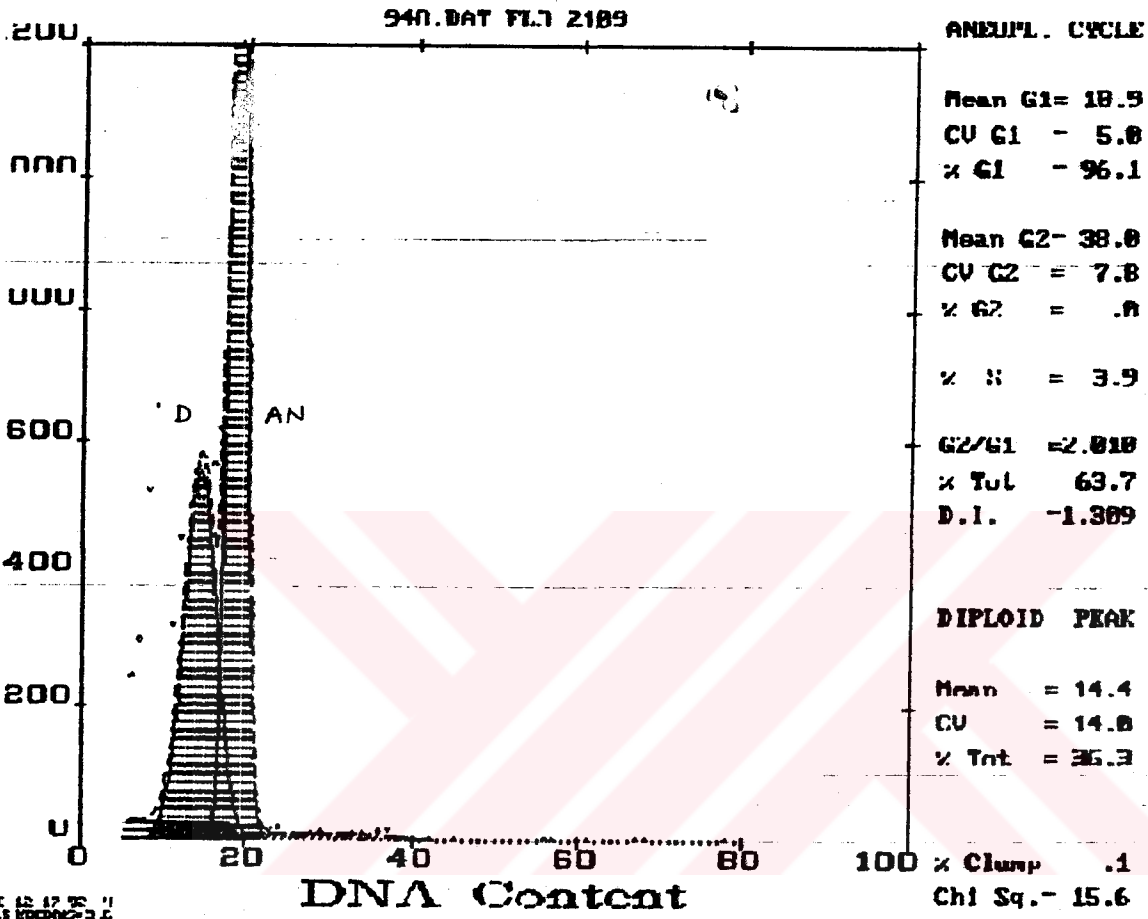
? %S ? = 24.1

G2/G1 = 2.010
% Tot = 39.1
D.I. = 1.454

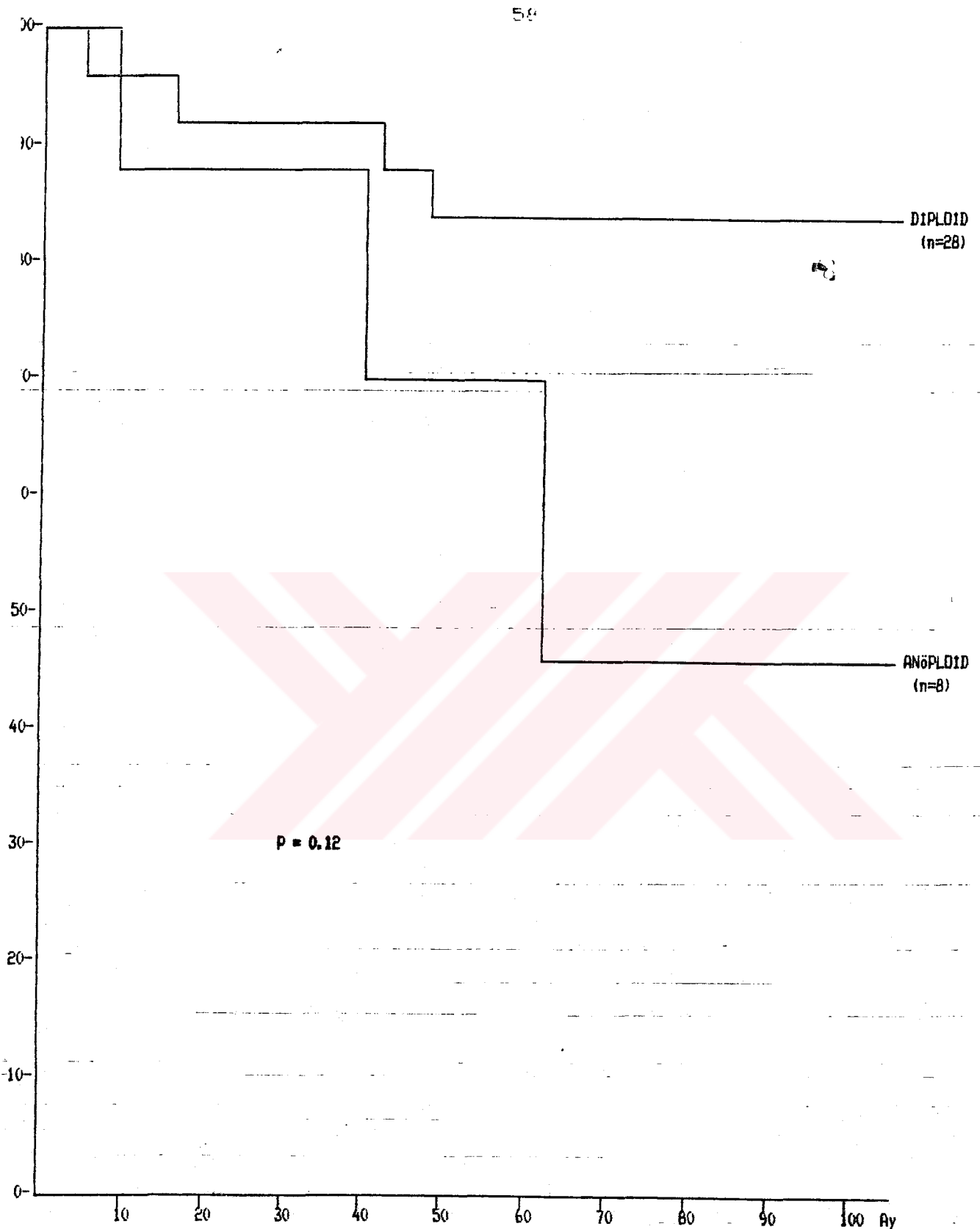
Ave. %S = 9.4

% Clump = 4.9
Chi Sq. = 22.0

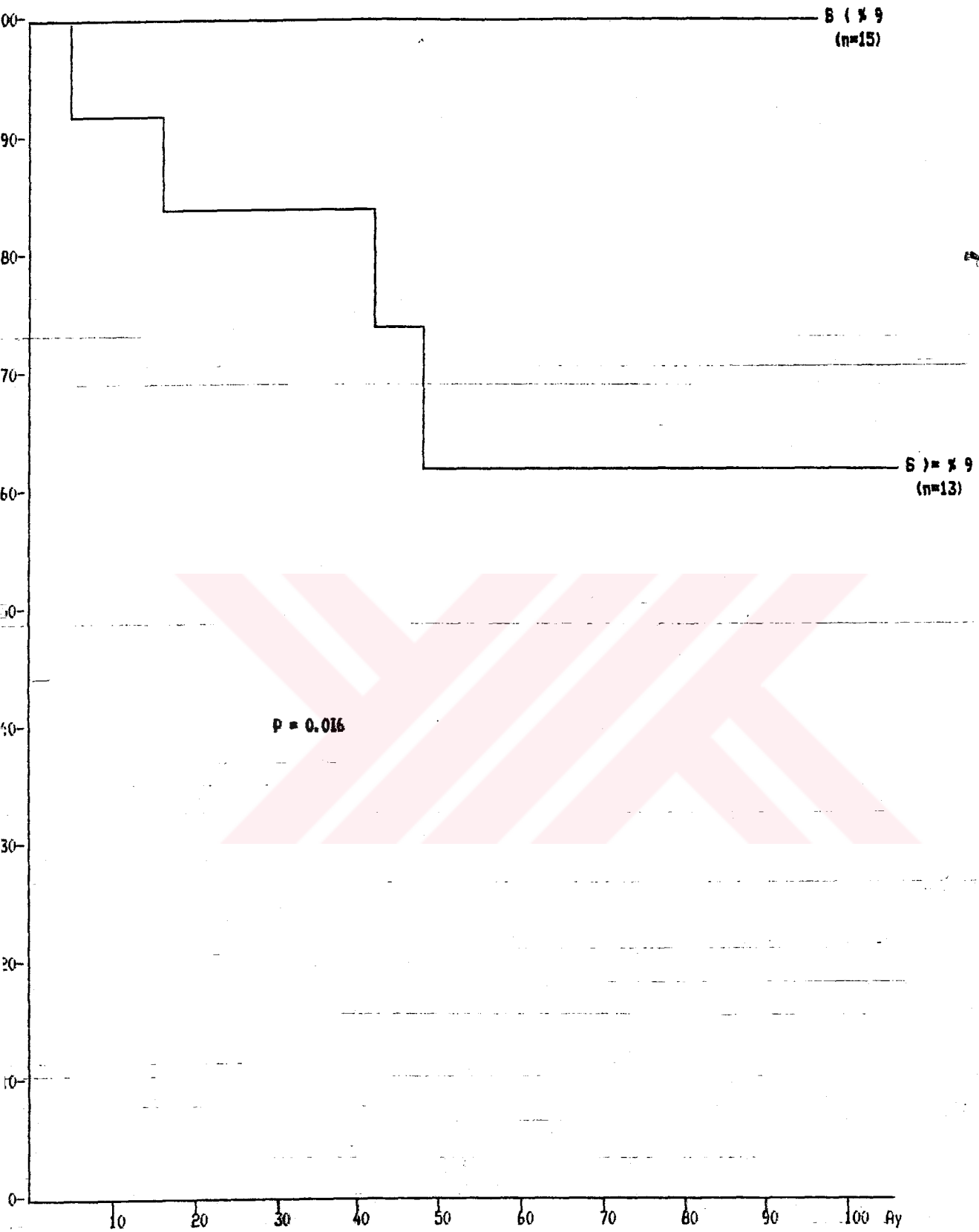
Sekil IIe. Belirgin anöplöid pik gösteren anöplöid histogram



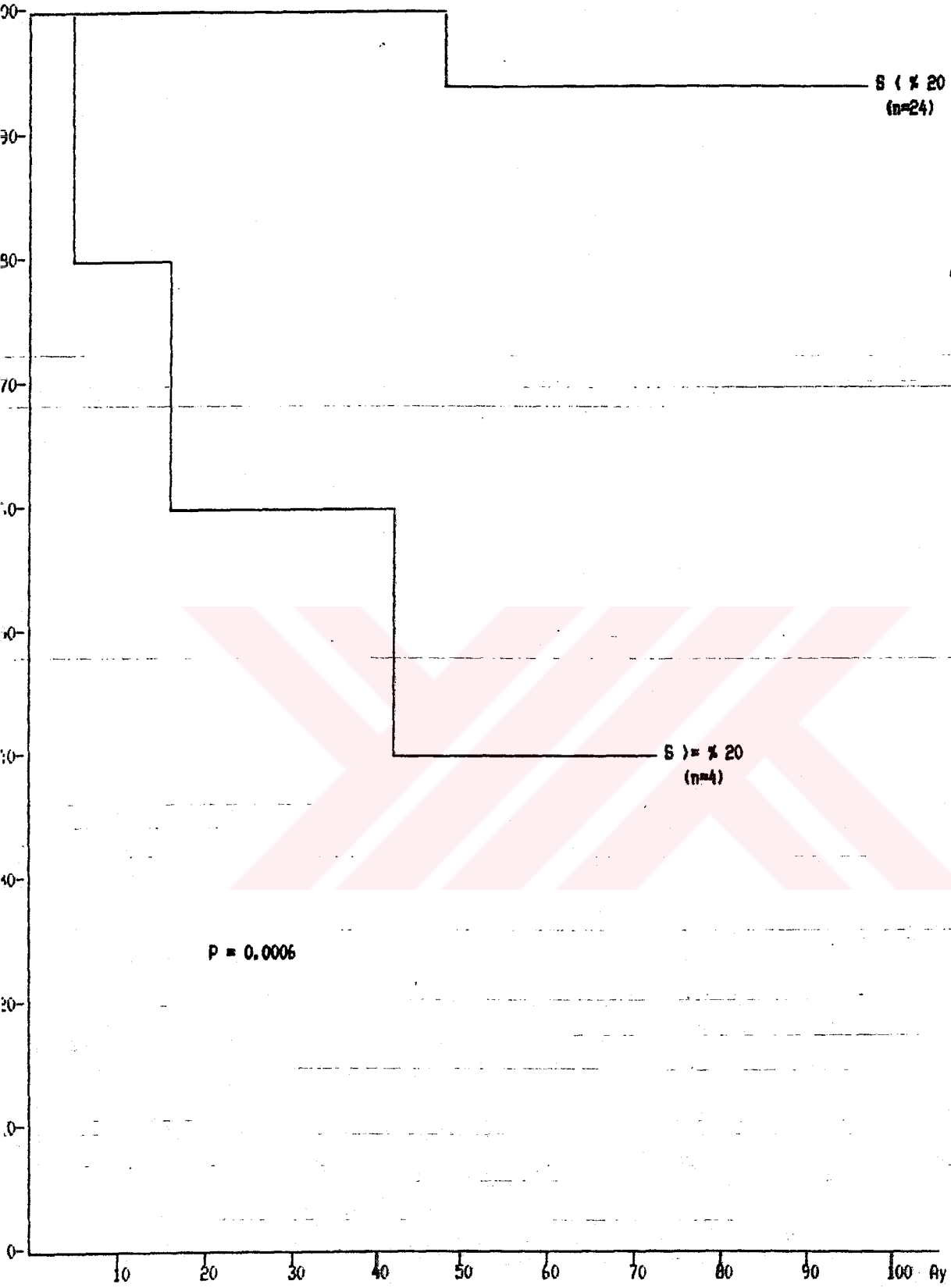
Şekil II f. Yüksek anöploid pik veren anöploid histogram



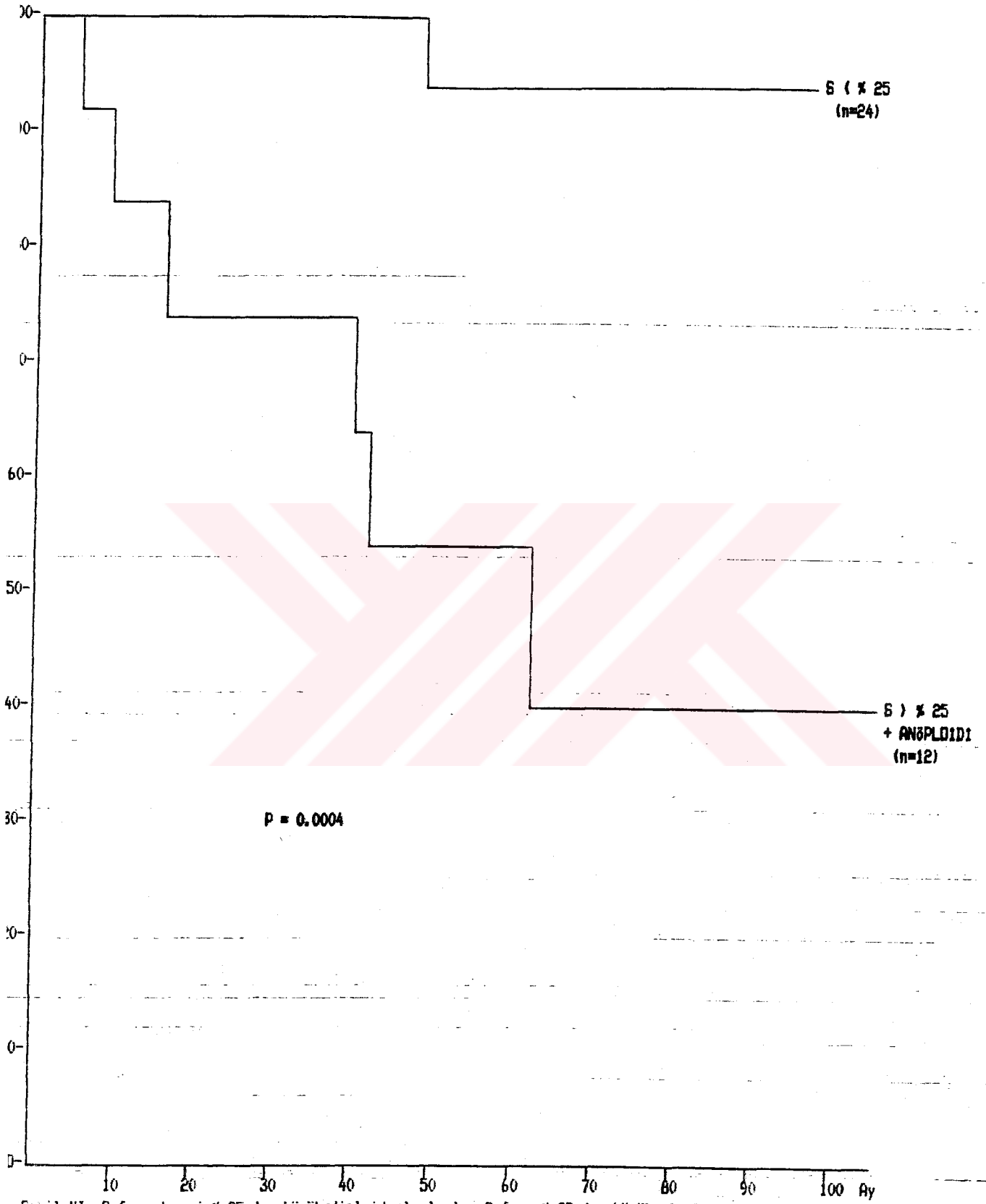
Şekil III. Endometrius kanserinde diploid ve anöplid popülasyonda Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri



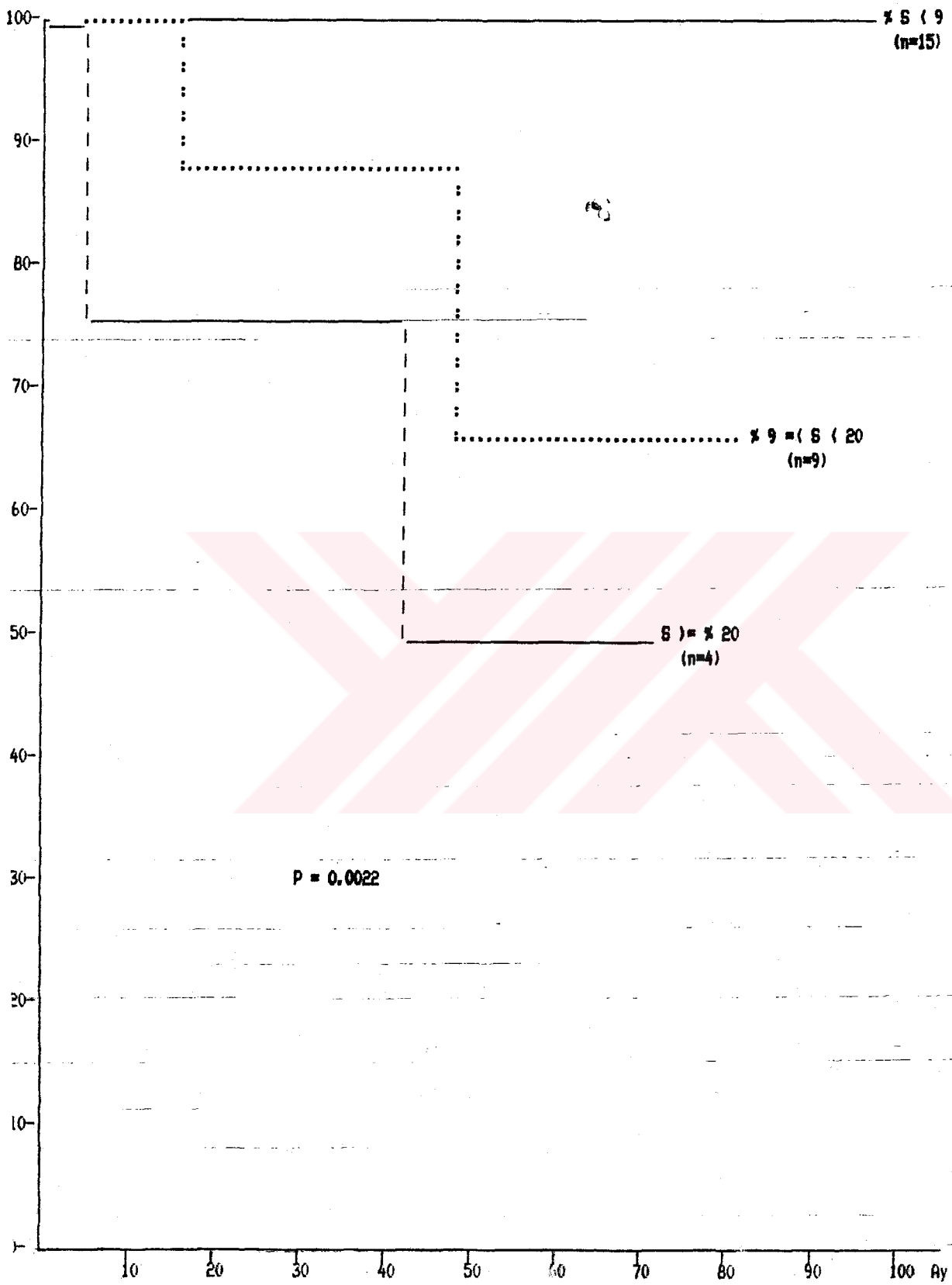
Şekil IV. Diploid grupta S fazı cut-off değeri ≤ 9 alındığında Kaplan-Meier hastalıksız yaşama eğrileri



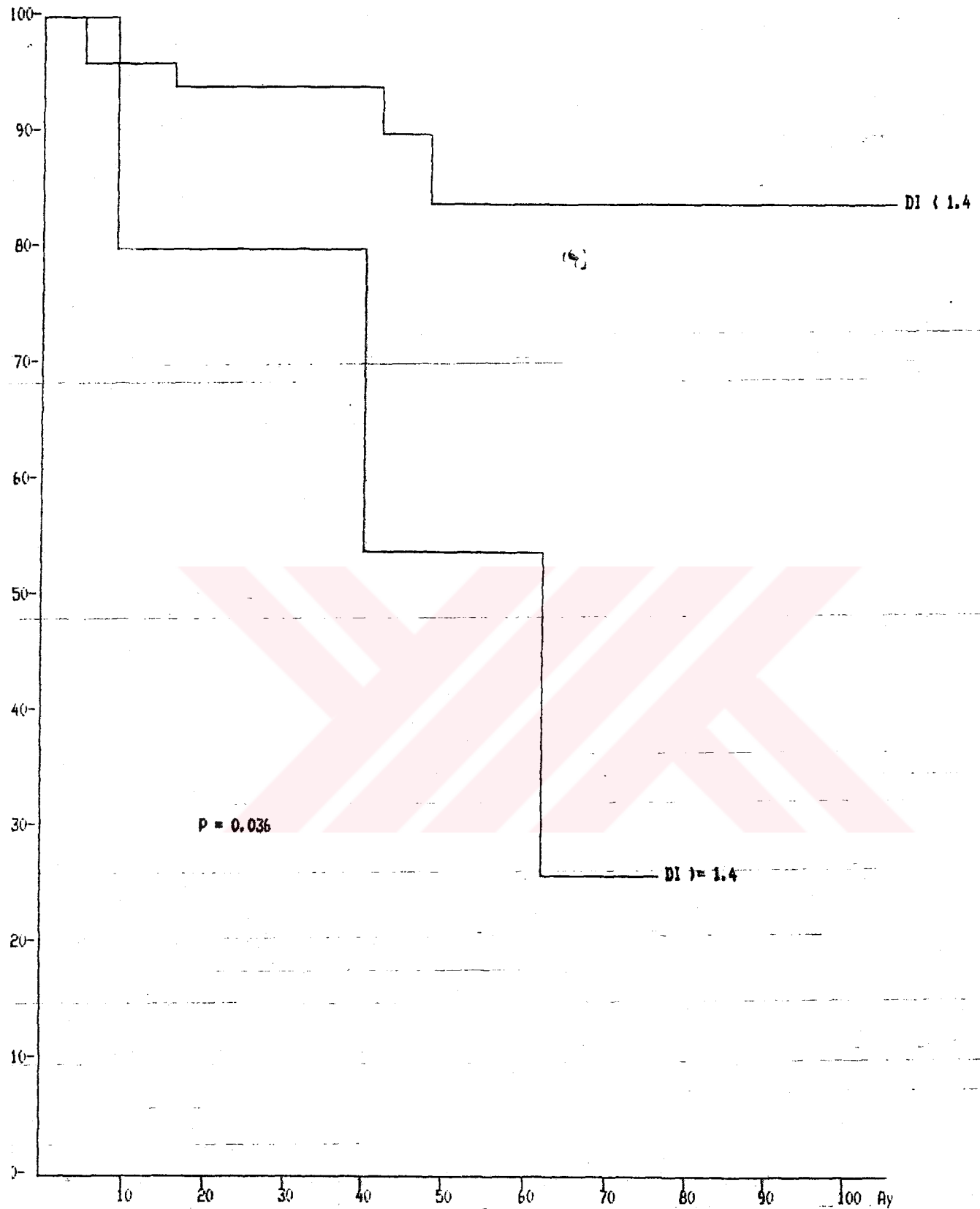
Şekil V. Diploid grupta S fazı cut-off değeri ≥ 20 alındığında Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri



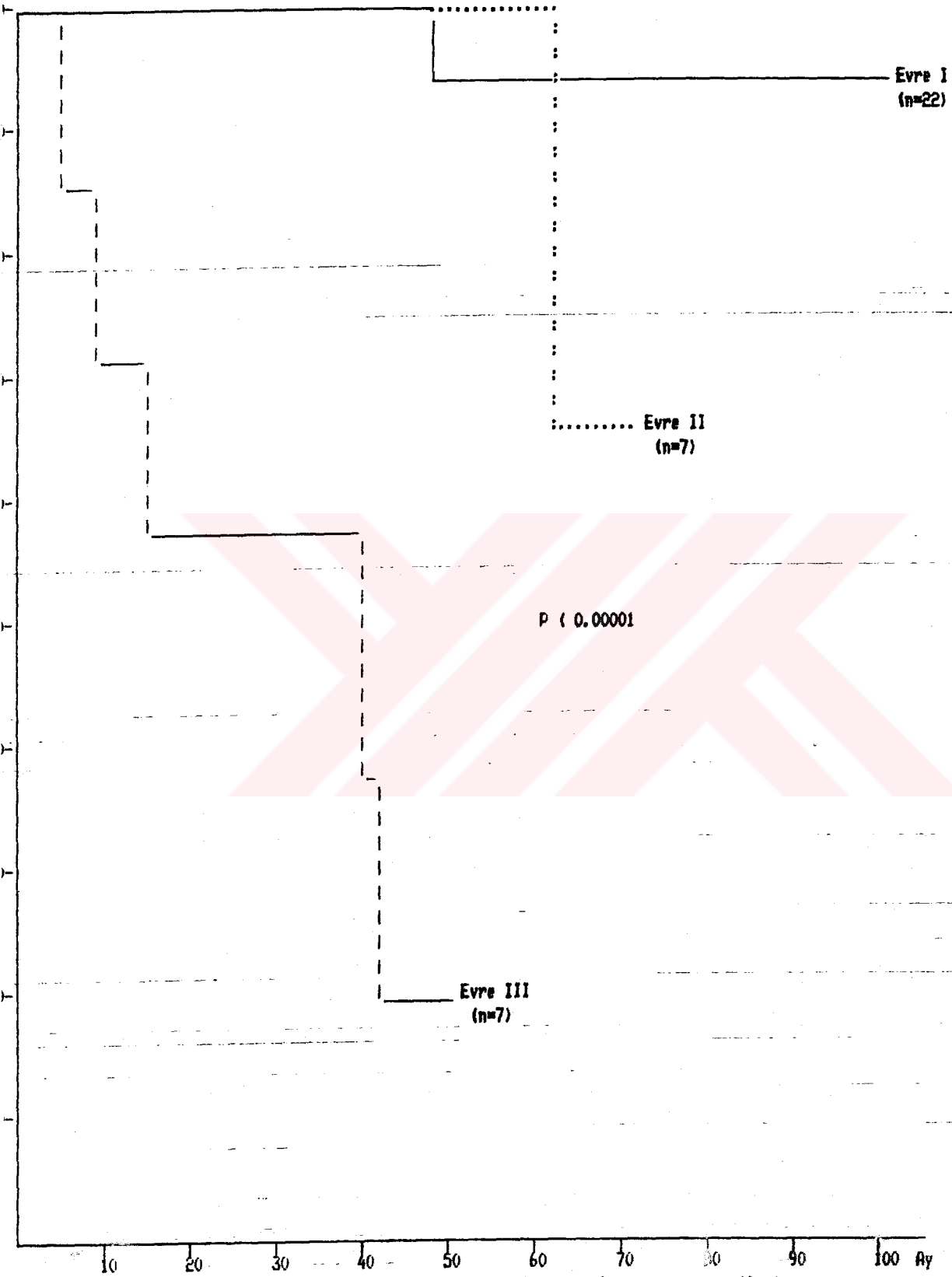
Şekil VI. S fazı değeri % 25 den küçük diploid olgularla, S fazı % 25 den büyük olgulara aneuploid olgular eklendiğinde oluşan Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri



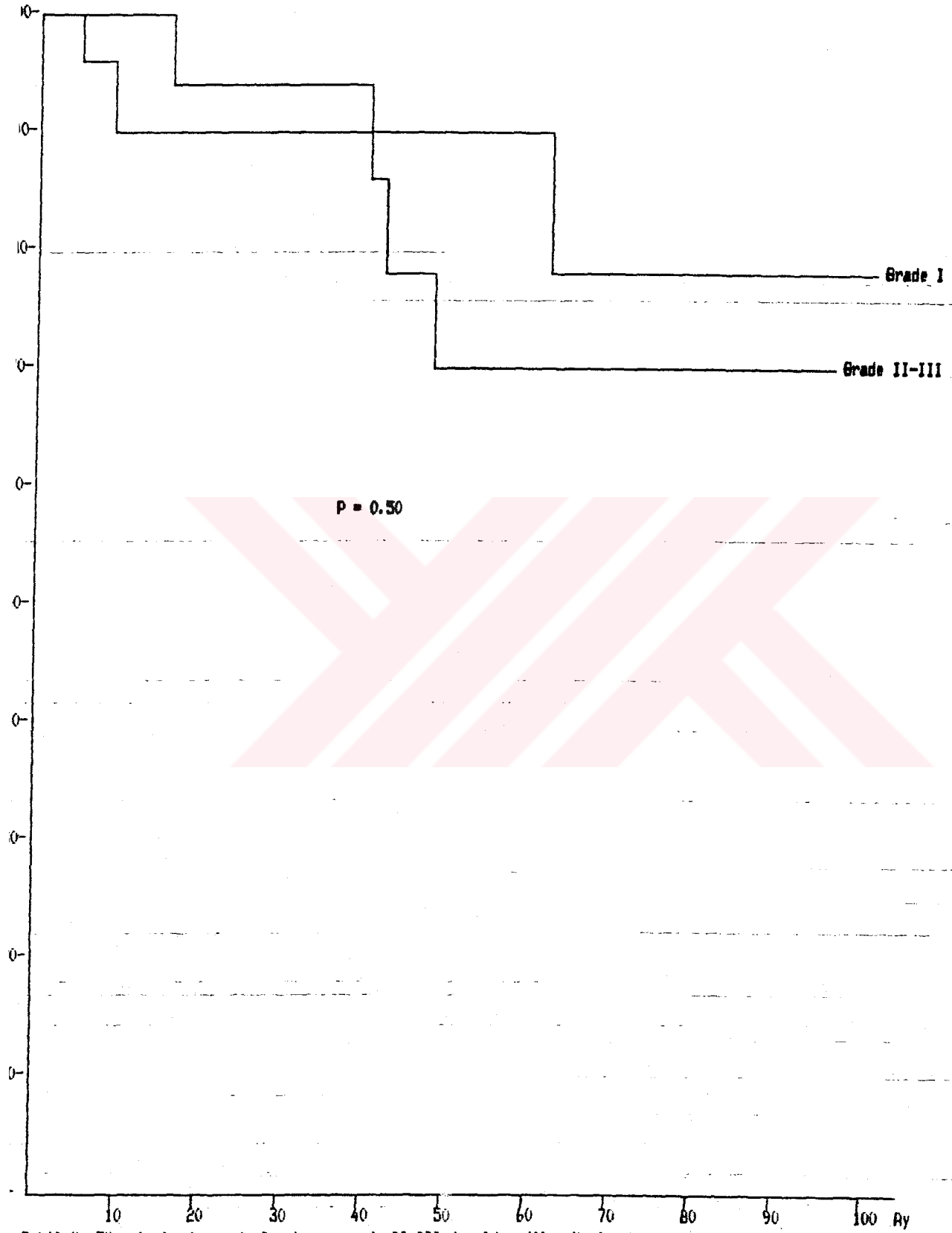
Şekil VII. Diploid grupta S fazı bölümlerine göre Kaplan-Meier hastaliksız yaşam eğrileri



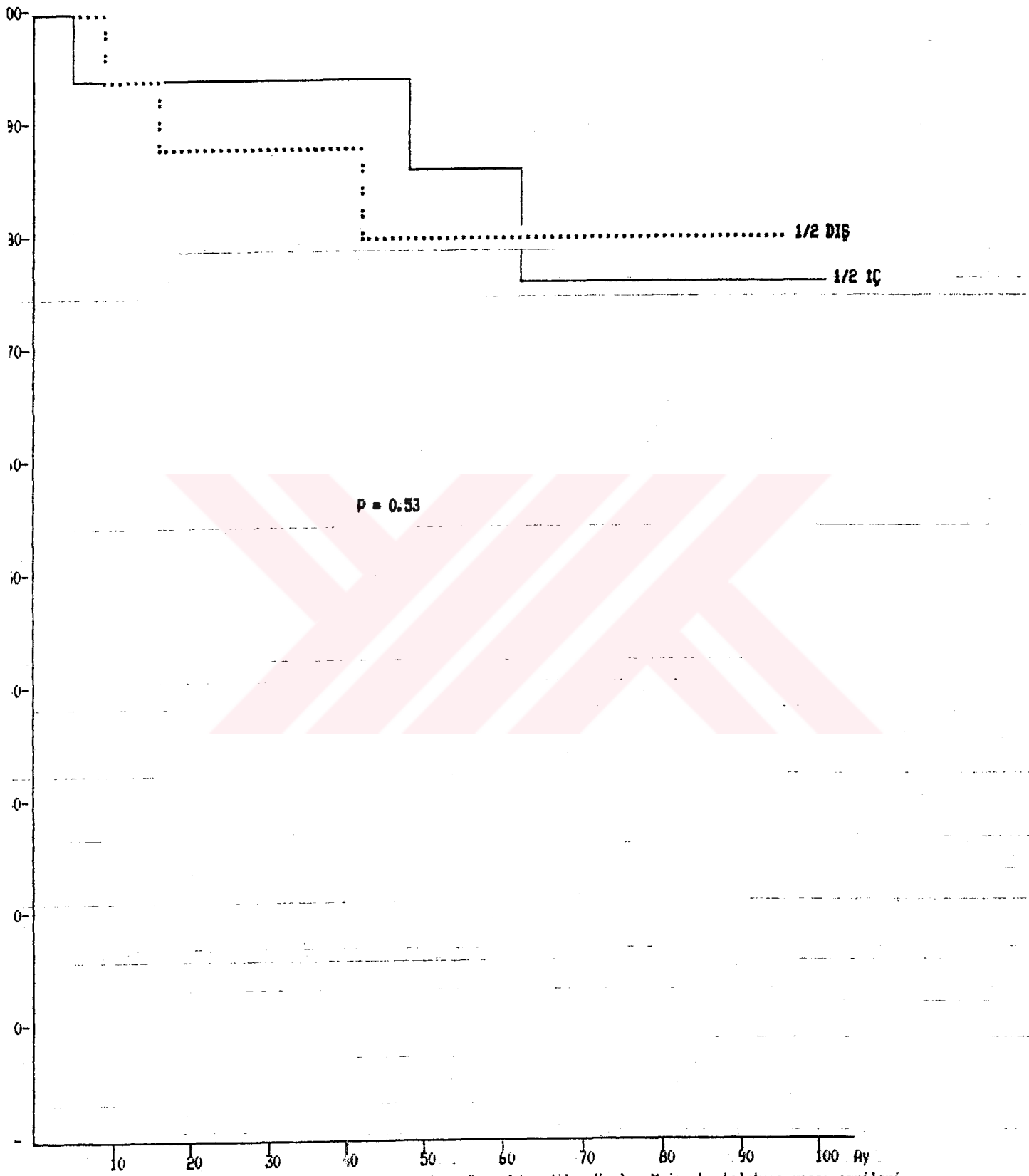
Şekil VIII. Tüm olgularda DNA indeksi (DI) için cut-off değeri 1.4 alındığında elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri (diploid grup için DNA indeksi 1.00 alınmıştır).



Sekil IX. Tüm olgularda evrelere göre elde edilen Kaplan-Meier hastaliksız yaşam eğrileri



Şekil X. Tüm olgularda grade I e karşı grade II+III de elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri



Şekil XI. Tüm olgularda myometrial invazyon derecesine göre elde edilen Kaplan-Meier hastalıksız yaşam eğrileri

TARTIŞMA

Klinisyenler, bir kanser hastasının tedavisini planlayabilmek için hastalığın seyrini önceden kestirebilmeyi sağlayacak prognostik faktörlerin belirlenmesine gereksinim duyarlar. Buna göre yüksek risk taşıyan kişilere daha agresif tedavi yöntemlerini uygulamak gerekmektedir. Halen evre, grade ve myometrial invazyon derinliği ile birlikte 10 faktörün daha endometrium kanserinin seyrini bağımsız olarak etkilediği bildirilmektedir (73-131). Tümör hücresindeki DNA'nın araştırılması da yeni sayılabilecek faktörlerden birisidir.

Atkin ve Moberger statik sitometri yöntemiyle yaptıkları araştırmalarında endometrium kanserinde DNA analizi çalışmalarının öncüsü olmuşlardır (65, 66). Bu iki araştırmacı diğer bazı çalışmacılar ile birlikte tümör hücre DNA'sını diğer histopatolojik parametrelerle ve sürvi ile karşılaştıran statik sitometri çalışmalarını yapmışlar ve bugünkü "flow sitometrik" DNA analizlerinin temel aldığı esasları ortaya koymuşlardır (63, 67-72). Flow sitometri statik sitometriye göre daha kısa sürede ve çok daha fazla sayıda hücre analizini yapmaya olanak sağlayan bir yöntemdir. (136, 137). Daha sonra Hedley'in parafinde saklanmış dokulardan çalışabilmeyi sağlayan tekniği geliştirmesi, flow sitometri yönteminin uygulama sahasını olağanüstü genişletmiştir (146-148). Bugün taze dokudan ve parafinde saklanmış materyalden yapılan flow sitometrik araştırmalar tümör-DNA çalışmalarının çok önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda DNA analizinin teknik kalitesinin bir ölçüsü sayılan VK (CV-coefficient of variation) ortalama 6.9 (1.9-9.9) bulunmuştur. Bu bulgu DNA analizinin teknik olarak yeterli olduğunu onaylamaktadır. En geniş seriye sahip olan Newburry'nin serisinde ortalama VK 6.2 (3.9-11.4) dır (54). Rosenberg ise % 14 ün altında VK varlığında piki diploid olarak nitelermeyi önermektedir (59). Kanımızca yüksek VK ları kabul etmek çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecektir. Çünkü halen mevcut flow sitometri cihazları diploid pikin % 67 civarındaki (DNA indeksi 0.94-1.06 dışına düşen) anöplid hücre-populasyonlarını ayırabilme yeteneğine sahiptir (145). Ayrıca kontrolü endometrium dokusu ile yapılan çalışmalarda normal endometrium hücrelerinin tümünün diploid pik DNA indeksinin 0.94-1.06 değerleri içinde yer aldığı gösterilmiştir (185).

Çalışmamızda geniş diploid pik içinde anöplid hücre populasyonlarının saklı kalabilme olasılığına karşı VK ları 10 un üzerinde olan olgular incelemeye alınmamıştır. VK ları 9 un üstünde olan ve tekrarlanan analizlerde yüksek kalmakta

sebat eden 8 olgu histogramda aşırı "debris kirlenmesi" olmadığı için çalışmaya alınmıştır.

Endometrium kanserinde anöploidi oranı % 18-43 arasında değişmektedir (54, 56, 58-61). Biz çalışmamızda 36 olgudan 8 inde (% 22) anöploidi saptadık. Ancak değişik çalışmalarda anöploidinin tanısında kullanılan kriterlere göre sıklığı da değişiklik göstermektedir. Halen kullanılan nomenklatür diploid pik yanında ikinci bir pikin görülmesini anöploidi kabul etmektedir (184). Ancak Lindahl bu kabülün near-diploid populasyonun atlanması riskini taşıdığını ileri sürmektedir (61). Lindahl 3 ayrı anöploidi tanımını test eden ve taze preparatı kullandığı bir klinik çalışmada, olguları DNA indeksi 0.94-1.06 üzerinde olanlar (metod A), DNA indeksi 0.92-1.08 üzerinde olanlar (metod B) ve diploid pik yanında ikinci pik gösterenler (metod C) olmak üzere 3 gruba ayırmış ve incelemiştir. Anöploidi tanımı olarak metod A kullanıldığında anöploid olguların oranı 110 olguda 15 olgu artarak % 28 den % 42 ye çıkmıştır. Ayrıca metod A ileri derecede prognostik değer taşıyan bir parametre olarak çıkarırken, metod C anlamlı bulunmamıştır.

Parafinde saklanmış dokuda çalışan ve ikinci bir pik varlığını anöploidi kabul eden Newburry, 233 olguluk geniş serisinde yalnızca % 18 hastada anöploidi saptamıştır. Bu çalışmada anöploidinin bağımsız bir prognostik faktör olmadığı, multivaryant analizde sadece eyre, DNA indeksi ve myometrial invazyonun prognostik değer taşıdığı gösterilmiştir (54). Parafinde saklanmış dokularda yapılan 7 çalışmadan yalnızca 1 tanesinde halen kullanılan tanımıyla anöploidinin prognostik değeri olduğu gösterilebilmiştir (52, 53, 56-59, 61).

Bizim çalışmamızda kullandığımız anöploidi tanımı Lindahl'in çalışmasındaki metod C ye uymaktadır. Serimizde anöploid grupta-5 yıllık hastaliksiz yaşam beklentisi % 83 den % 70 e inmektedir, ancak bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.12$, şekil III). Çalışmalarda anöploidinin prognostik değerinin yeterince gösterilememesinin bir nedeni Lindahl'in ileri sürdüğü gibi belki de anöploid olguların bir kısmının kaçırılmasıdır. Newburry, kontrol-preparatlarının kullanılmasının anöploidi oranını artırdığını, kendisinin 233 olgudan 109 unda kontrol preparatı kullanarak anöploid olgulara 2 olgu eklediğini bildirmektedir. Bir başka neden ise endometrium kanserinde değişik histolojik tiplerde anöploidi oranının farklı olması olabilir. Papiller seröz karsinom ve berrak hücreli karsinom gibi tiplerde anöploidi oranı daha yüksek olurken, bizim çalışma grubumuzu oluşturan olgularda olduğu gibi endometrium adenokarsinomunda anöploidi oranı daha düşük olmaktadır (54). Ayrıca atlandığı düşünülen

near-diploid olguların klinik seyrinin diploid olgulardan farklı olduğunu gösterir veriler de yoktur, kötü seyrettiği bilinen anöploid olgular bizim çalışmamızda da saptandığı gibi zaten DNA indeksi yüksek olan olgulardır (54,62). Ayrıca tümör dokusundaki DNA içeriğinin heterojen olarak dağıldığını ve bu nedenle doğru değerlendirme için her tümör de birden fazla sayıda analiz yapmanın gerekliliği vurgulanmaktadır (54).

İleri sürülebilecek bir başka neden preoperatif radyoterapinin etkisiyle anöploid popülasyonun silinmesi olabilir. Çalışma grubumuzdaki preoperatif radyoterapi uygulanan (n=20) ve uygulanmayan (n=16) olgular benzer özelliklere sahip idi ve preoperatif radyoterapinin herhangi bir parametreyi değiştirdiğine dair delil elde edilemedi. (Tablo XXVII ve XXVIII). Ayrıca Newburry'nin serisindeki 233 olgudan preoperatif radyoterapi yapılan 117 sinde örnekleme yöntemi ile yapılan araştırmada preoperatif radyoterapinin anöploidi ve DNA indeksini değiştirmedeği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda tümör hücresindeki S fazının önemli bir prognostik parametre olduğu gösterilmiştir (şekil 4-7). En az 48 ay süreyle takip edilmiş diploid olgular üzerinde yapılan diskriminant analizi S fazının % 7, % 9, % 20 ve % 25 değerlerinin anlamlı ayırıcı değerler olduğunu ortaya koymuştur (Tablo XXII). % 7 ile % 9 ve % 20 ile % 25 arasında durumu değişen olgu olmadığından 9 ve 20 değerleri tüm olguları 3 ayrı risk grubuna ayırmak için sınır değerler olarak kabul edilmiştir (Tablo XXV, şekil 7). Kanski ise risk grubu ayırımı için sınır değer olarak medyan değeri önermektedir (56). Bulgularımız Rosenberg, Takahashi ve Geisinger'in bulgularını onaylamaktadır. Takahashi endometrium kanserinde kanser hücresinin normal endometrium hücresinden daha fazla S fazı oranına sahip olduğunu ve endometrium kanserinde evre III ve evre IV de S fazının prognostik değeri olduğunu göstermiştir (58). Geisinger S fazının prognostik değerinin evreye göre düzeltme yapınca azaldığını bildirmektedir (60). Newburry'nin serisinde S fazı % 8 in üzerinde sadece 6 olgu olduğundan bu parametrenin değerlendirilmesi yapılamamaktadır (54). Lindahl ise S fazının prognostik faktör olarak görülmediğini ancak grade ile ilişkili bulunduğunu bildirmektedir (61). Çalışmamızda S fazı değerleri, grade ve myometrial invazyon derinliğinden etkilenmeyen bağımsız bir prognostik parametre olarak görülmektedir (tablo XIX-XXI).

DNA indeksi, çalışmamızda evre ve S fazının ardından anlamlı bulunan 3. parametredir (Tablo XXIV ve XXV, şekil VIII). DNA indeksi 1.4 ün üzerinde olan kişilerde hastaliksız yaşam beklentisi 1.4 ün altında olan ve diploid olgulara göre anlamlı derecede azalmaktadır (p=0.036). DNA indeksi parafinde saklanmış materyalde yapılan 7 çalışmadan 5 inde

ve taze preperatta yapılan 4 çalışmanın tümünde prognostik faktör olarak saptanmıştır (53, 54, 56, 57, 59-62, 64-66). Newburry DNA indeksini evreden sonraki en değerli prognostik faktör olarak vermekte ve 1.5 üzerindeki değerlerde hastalığın agresif seyrettiğini bildirmektedir (54). Çalışmamızda DNA indeksinin 60 yaş üzerindeki olgularda anlamlı artışı ilgi çekici bir bulgu olarak kaydedilmiştir (Tablo XX).

Çalışmamızda DNA parametreleri yanısıra sürvi ile ilişkileri araştırılan ve endometrium kanserindeki en önemli prognostik faktörler olarak bilinen evre, histolojik grade ve myometrial invazyondan sadece evrenin prognostik değeri olduğu görülmüştür (Tablo XXV). Geisinger kendi serisinde bu 3 faktörden evre ve histolojik grade'in prognostik olduğunu göstermiş, myometrial invazyon ise anlamlı bulunmamıştır. Ancak multivaryant analizde evreye göre düzeltme yapılmış histolojik grade'in de istatistik anlamının kaybolduğu görülmektedir (60). Newburry 233 olguluk serisinde multipl regresyon analizinde evre, DNA indeksi ve myometrial invazyonu istatistik anlam veren faktörler olarak bulmuş ve bu üç faktöre göre düzeltme yapılmış histolojik grade'in ek prognostik katkı getirmediği görülmüştür (54). Bizim çalışmamızda grade ve myometrial invazyonun anlamlı bulunmaması kanımızca büyük bir seriye sahip olmamızdan kaynaklanmaktadır. Preoperatif radyoterapi yapılan 20 olguda tümör dokusunun tahrip olması nedeniyle histolojik grade ve myometrial invazyon derinliğinin etkilenmiş olabileceği de ileri sürülebilir. Ancak preoperatif radyoterapinin daha çok grade I tümörlere etkili olduğu ve az diferansiye tümörlerin cerrahi olarak çıkarılmış spesimenlerde persiste etmeye devam ettikleri gösterilmiştir (186). Aynı şekilde preoperatif radyoterapi yapılmış olgularda anöploid tümörlerin derin myometrial invazyon yapma eğilimini koruduğu görülmüştür (187).

Çalışmamızda anöploidi sıklığının evre I de % 18 iken, evre III de % 43 e ulaştığını saptadık (tablo XIX). Ancak farkın istatistik anlamı olmadığı görüldü ($\chi^2=0.77$). Diğer bazı çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir (54, 62). Taze ve parafinize dokularda yapılan bazı çalışmalarda anöploidinin az diferansiye tümörlerde daha fazla görüldüğü iddia edilmektedir (54, 55, 58, 59, 62, 64, 66). Geisinger'in serisinde ise anöploidi ile grade arasında ilişki bulunmamıştır (60). Bizim serimizde de grade ile anöploidi arasında ilişki saptanmamıştır ($p=0.48$, tablo XX). Anöploid tümörlerde myometrial invazyon derinliğinin diploid tümörlerden daha fazla olduğu ileri sürülmektedir (54, 61, 64). Iversen' in ve bizim serimizde ise anöploidi ile myometrial invazyon arasında ilişki saptanmamıştır (tablo XXI). Wagenius ve arkadaşları, preoperatif intrakaviter radyoterapi yapılan 129 evre I ve evre II endometrium kanseri olgusunda DNA

parametreleri ile rezidiv tümördeki myometrial invazyon derinliğini karşılaştırmışlar , anöploid tümörlerin irradiye ve cerrahi olarak çıkarılmış spesimenlerde dahi anlamlı olarak daha derin myometrial invazyon yapma eğiliminde olduğu görülmüştür (187).

Çalışmamızın sonuçlarından bir diğeri 60 yaşın üzerindeki olgularda S fazı ortalama değerlerinin ve anöploidi sıklığının anlamlı artışı olmuştur (Tablo XVIII). Aynı şekilde 60 yaş üzerinde DNA indeksinin anlamlı olarak 1.4 ün üzerinde yer aldığı görülmektedir (Tablo XXIV). Benzeri çalışmaların herhangi birisinde bu ilişki incelenmemiştir. Frick ve arkadaşları evre I deki endometrium kanserlerinde yaptıkları çalışmalarında 60 yaş üzerindeki olgularda 5 yıllık yaşam beklentisinin % 80 den % 56 ya indiğini göstermişlerdir (85). Bunun nedeni Jones'un ileri sürdüğü gibi erken yaşta görülen kanserlerin genellikle daha düşük grade'li, daha düşük evreye sahip ve daha küçük olmalarına bağlı olabileceği gibi (86) , çalışmamızın ortaya koyduğu gibi DNA parametrelerinin yükselmesine de bağlı olabilir. Yaş ile DNA içeriği ilişkisini ortaya koyabilmek için geniş serilerde yapılmış multivaryant prognoz çalışmalarına gereksinim vardır.

SONUÇ

Endometrium kanseri olan olgularda tümör hücre DNA sının flow sitometrik yöntemle yapılan analizinde;

- 1 . S fazı yüzde değerlerinin, hastalıksız yaşam beklentisi ile ölçülen sürviyi etkileyen bir prognostik faktör olduğu görülmüştür.
- 2 . DNA indeksinin 1.4 ün üzerinde olmasının hastalıksız yaşam beklentisini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.
- 3 . Altmış yaşın üzerindeki olgularda 3 DNA parametresi de yükselmiş olarak bulunmaktadır. Endometrium kanserinde 60 yaş üzerinde hastalığın daha kötü seyretmesinde artmış DNA içeriğinin rolü olabilir.
- 4 . Anöploidinin diğer DNA parametreleri gibi prognostik bir faktör olarak gösterilememesinin nedeni halen kullanılan anöploidi tanımı olabilir. Ayrıca DNA parametrelerinin anöploidide olduğu gibi kalitatif ölçümlerle değerlendirilmesi yerine , S fazı ve DNA indeksinde olduğu gibi kantitatif ölçümlerle değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçlar vermektedir.
- 5 . Histolojik grade ve myometrial invazyon gibi kuvvetli prognostik faktörlerin anlamlı bulunmadığı bu çalışmada DNA parametrelerinin prognostik rolünün gösterilmesi, DNA içeriğinin göreceli olarak önemli bir prognostik faktör olduğunu da göstermektedir.

Kaynaklar :

- 1 . Barlogie B, Drewinko B, Schumann J et al: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. Am J Med, 69:195,1980).
- 2 . Petersen SE, Lorentzen M, Bichel P: A mosaic subpopulation structure of human colorectal carcinomas demonstrated by flow cytometry. Cytometry 4:412,1980
- 3 . Gustafson H: DNA patern , histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumors. Scand J Urol Nephrol 16(2):135,1982
- 4 . Zetterberg A, Esposito PL: Prognostic significance of nuclear DNA levels in prostatic carcinoma. Scand J Urol Nephrol 55(suppl):53,1980
- 5 . Auer GV, Caspersen TD, Wallgren AS: DNA content and survival in mammary carcinoma Analyt Quant Cytol 2:161,1980
- 6 . Blondal T, Bengtsson A: Nuclear DNA measurements in squamous cell carcinoma of the lung: A guide for prognostic evaluation. Anticancer Research 1:79,1981
- 7 . Danova M et al: Ploidy and proliferative activity of human gastric carcinoma : A cytofluorometric study on fresh and paraffin-embedded tissue. Basic Appl Histochem 31(1):73,1987
- 8 . Matssuura H et al: Malignant potentiality of squamous cell carcinoma of the esophagus predictable by DNA analysis. Cancer 57:1810,1986
- 9 . Chen RB et al: Flow cytometric analysis of benign and malignant tumors of the oral and maxillofacial region. J Oral Maxillofac Surg 47(6):56,1989
- 10 . Ezaki T et al: Dna analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. Cancer 61:106,1988
- 11 . Baisch H et al: DNA content of human kidney carcinoma cells in relation to histological grading. Br. J Cancer 45:878,1982
- 12 . Fossa SD et al: Dna flow cytometry in human testicular cancer. Cancer Lett. 28(1):55,1985
- 13 . Hamming JF et al: Prognostic value of nuclear DNA content in papillary and follicular thyroid cancer. World J Surg 12:503,1988
- 14 . Kreibergs A et al: DNA flow analysis of soft tissue tumors. Cancer 59:128,1987
- 15 . Barlogie B et al: Prognostic implications of tumor cell DNA and RNA content in multiple myeloma. Blood 66:338,1985
- 16 . Joensuu H et al: Prognostic value of DNA ploidy and proliferative activity in Hodgkin's disease. Am J Clin Pathol 90:670,1988

- 17 . Andreff M et al: Prognostic value of DNA/RNA flow cytometry of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: development of laboratory model and correlation with taxometry. Ann NY Acad Sci 468:368,1986
- 18 . Andreff M et al: Prognostic value of DNA/RNA flow cytometry in myeloblastic and lymphoblastic leukemia in adults. Ann NY Acad Sci 468:387,1986
- 19 . Kheir SM et al: Prognostic significance of DNA aneuploidy in stage I cutaneous melanoma. Ann Surg 207:455,1988
- 20 . Anniko M et al: DNA ploidy and cell phase in human pituitary tumors. Cancer 53(8):1708,1984
- 21 . Atkin NB: Clinical significance of ploidy in carcinoma of the cervix: it's relation to prognosis Br Med J 2:1445,1962
- 22 . Davis JR et al: DNA ploidy, grade and stage in prognosis of uterine cervical cancer Gynecol Oncol 32(1):4,1989
- 23 . Dudzinski MR et al: DNA content of cervical neoplasia and its relationship to prognosis Obstet Gynecol 69(3 Pt1) :373 ,1987
- 24 . Jacobsen A et al : Prognostic influence of ploidy level and histopathologic differentiation in cervical carcinoma stage Ib. Eur J Cancer Clin Oncol 24:969,1988
- 25 . Jacobsen A: Ploidy level and short-time prognosis of early cervix cancer. Am J Clin Oncol 7:475,1984
- 26 . Rutgers DH et al: DNA flow cytometry of squamous cell carcinomas from the human uterine cervix: The identification of prognostically different subgroups. Radiother Oncol 7(3):249,1986
- 27 . Strang P, Eklund G, Stendahl U et al: S phase rate as a predictor of early recurrences in carcinoma of the uterine cervix. Anticancer Res 7:807,1987
- 28 . Dyson JED, Joslin CAF, Rothwell RI, Quirke P, Khoury GG, Bird CC: Flowcytometric evidence for the differential radioresponsiveness of the aeploid and diploid cervix tumors Radiother Oncol 8:263,1987
- 29 . Christov K, Vassilev N: Flow cytometric analysis of DNA and cell proliferation in ovarian tumors Cancer 61:121,1987
- 30 . Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PAM, Hermans J, Fleuren GJ: Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. Cancer 59:317,1987
- 31 . Iversen OE, Skaarland E: Ploidy assesment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry: A clinicopathologic study. Cancer 60:82,1987
- 32 . Friedlander ML, Taylor IW, Russell P, Musgrove EA, Hedley DH, Tattersall MH: Ploidy as a prognostic factor in ovarian cancer. Int J Gynecol Pathol 2:55,1983

- 33 . Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer *Cancer Res* 44(1):397, 1984
- 34 . Friedlander ML, Hedley DW, Swanson C, Russell P: Prediction of long term survival by flowcytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer *J Clin Oncol* 6:282, 1988
- 35 . Iversen OE: Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma *Cancer* 61:971, 1988
- 36 . Kallioniemi DP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T: Prognostic significance of DNA index, multiploidy and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 61:334, 1988
- 37 . Rodenburg CJ et al: DNA flow cytometry and morphometry as prognostic indicators in advanced ovarian cancer: a step forward in predicting the clinical outcome. *Gynecol Oncol* 29(2):176, 1988
- 38 . Volm M, Brüggemann A, Günther M, Kleine W, Pfeleiderer A, Vogtschaden M: Prognostic relevance of ploidy, proliferation and resistance predictive tests in ovarian carcinoma *Cancer Res* 45:5180, 1985
- 39 . Wils J et al: Proposal for therapeutic approach based on prognostic factors including morphometric and flow cytometric features in stage III-IV ovarian cancer. *Cancer* 61:1920, 1988
- 40 . Baak JP: Evaluation of the prognostic value of morphometric features and cellular DNA content in FIGO I ovarian cancer patients. *Anal Quant Cytol Histol* 9:287, 1987
- 41 . Blumenfeld D et al: Tumor DNA content as a prognostic feature in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 27:389, 1987
- 42 . Erhardt K et al: Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer Res* 44:2198, 1984
- 43 . Fowler WC et al: Significance of multiparameter flow cytometric analysis of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 158(4):838, 1988
- 44 . Klemi PJ et al: Clinical significance of abnormal nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer* 62:2005, 1988
- 45 . Kuhn W et al: DNA flow cytometry, clinical and morphological parameters as prognostic factors for advanced malignant and borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 33(3):360, 1989
- 46 . Barnabei VM et al: Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 162:1584, 1990

- 47 . Hemming JD: Flow cytometry in persistent trophoblastic disease. *Placenta* 9(6):615,1988
- 48 . Lage JM et al: The biology of tetraploid hydatidiform moles: histopathology , cytogenetics and flow cytometry. *Hum Pathol* 20(5):419,1989
- 49 . August CZ, Bauer KD, Lurain J, Murad T: Neoplasms of endometrial stroma: Histopathologic and flow cytometric analysis with clinical correlation . *Hum Pathol* 20:232,1989
- 50 . Tsusima K et al: Uterine leiomyosarcomas and benign smooth muscle tumors:usefulness of nuclear DNA patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clinic Proceed* 63(3):248,1988
- 51 . Tase T, Toki T, Oikawa N, Wada Y, Yajima A, Suzuki M: Flow cytometric DNA analysis of human endometrial carcinoma *Tohoku J Exp Med* 146:429,1985
- 52 . Quillamor RM, Furlong JW, Hoschner JA, Wynn RM : Relative prognostic significance of DNA flow cytometry and histologic grading in endometrial carcinoma. *Gynecol Obstet Invest* 26:332,1988
- 53 . van der Putten HWHM, Baak JPA, Koenders TJM, Kurver PHJ, Stolk HG, Stolte LAM: Prognostic value og quantitative pathologic features and DNA content in individual patients with stage I endometrial carcinoma. *Cancer* 63:1378,1989
- 54 . Newburry R, Schuerch C, Goodspeed N, Fanning J, Glidewell O, Evans M: Dna content as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 76:251,1990
- 55 . Kysela B, Siracky J, Redecha M, Bardos A : Flow cytometry analysis of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Neoplasma* 37(5):489,1990
- 56 . Konski AA, Myles JL, Sawyer T, Neisler J, Phibbs G, Leininger S, Kim K, Dobelbower RR: Flow cytometric DNA content analysis of paraffin block embedded endometrial carcinoma. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 21:1033,1991
- 57 . Naus GJ, De Vere R, Richart RM, Deitch AD: Predictive value of flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue in endometrial carcinoma . *Lab Invest* 52:48A(abstract),1985
- 58 . Takahashi Y, Matsumoto H, Wakuda K, Ishiguro T, Yoshida Y: *Asia Oceania J Obstet Gynecol* 17(1):73,1991
- 59 . Rosenberg P, Wingren S, Simonsen E et al: Flow cytometric measurements of DNA index and S phase on paraffin-embedded early stage endometrial cancer: An important prognostic indicator. *Gynecol Oncol* 35(1):50,1989

- 60 . Geisinger KR, Homesley HD, Morgan TM, Kute TE, Marshall RB: Endometrial adenocarcinoma: A multiparameter clinicopathologic analysis including the DNA profile and the sex steroid hormone receptors. *Cancer* 58:1518,1986
- 61 . Lindahl B, Alm P, Fernö M, Killander D, Langstrom E, Norgren A, Trope C: Prognostic value of flow cytometrical DNA measurements in stage I-II endometrial carcinoma : Correlations with steroid reseptor concentration , tumor myometrial invasion and degree of differentiation . *Anticancer Research* 7:791,1987
- 62 . Iversen DE: Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: A prognostic factor in endometrial carcinoma . *Am J Obstet Gynecol* 155:770,1986
- 63 . Feichter GE, Höffken H, Heep J et al: DNA flow cytometric measurements on the normal, atrophic, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Virchow Arch Pathol Anat A.* 398:53,1982
- 64 . Symonds DA: Prognostic value of pathologic features and DNA analysis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 39(3):272,1990
- 65 . Atkin NB: Prognostic significance of ploidy level in human tumors. 1. Carcinoma of the uterus *JNCI* 56:909,1976
- 66 . Moberger B, Auer G, Forfslund G: The prognostic significance of DNA measurement in endometrial carcinoma *Cytometry* 5:430,1985
- 67 . Sprenger E, Hilgarth M, Vogt-Schaden M: The diagnosis of endometrial carcinoma by means of jet wash and DNA flow-through cytophotometry. *Path Res Prac* 162:263,1978
- 68 . Hustin J: Morphology and DNA content of endometrial cancer nuclei under progestogen treatment. *Acta Cytol* 20:556,1976
- 69 . Ferenczy A: Cytodynamics of endometrial hyperplasia and neoplasia. Part II. in vitro DNA histoautoradiography. *Hum Pathol* 14:77,1983
- 70 . Sachs H, Wambach EU, Würthner K: Zytofotometrisch ermittelter DNS-Gehalt in normalen, hyperplastischen und Karzinomatösen menschlichen endometrium. *Arch Gynak* 217:349,1974
- 71 . Siracky J, Maloska J, Siracka E: Cell proliferation kinetics in gynecologic cancer. *Neoplasma* 24:327,1977
- 72 . Wagner D, Richart RM, Turner JY: Deoxyribonucleic acid content of presumed precursors of endometrial carcinoma. *Cancer* 20,2067,1967
- 73 . *Cancer statistics -A cancer journal for clinicians.* 38:5,1988

- 74 . Silverberg E: Gynecologic cancer: statistical and epidemiologic information , American Cancer Society Publication 1975
- 75 . Mattingly RF: Malignant tumors of the uterus. TeLinde's Operative Gynecology , 5 ed., Lippincott, Philadelphia, p 779
- 76 . Muir C, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan S: Cancer in five continents , Vol V, IARC Scientific Publications, No 88, Lyon , 1987
- 77 . Zdeb MS: The probability of developing cancer. Am J Epidemiol 106:6, 1977
- 78 . Axtell LM, Asire A, Myers MH: Cancer patient survival. Report no 5. DHEW publication no 77-992, 1976
- 79 . Devesa SS, Silverman DT, Young JL Jr: Cancer incidence and mortality trends among whites in united states 1947-1984 . J Natl Cancer Inst . 704:724, 1987
- 80 . Ries LG, Pollack ES , Young JL : Cancer patient survival: surveillance , epidemiology and end results program 1973-1979. J Natl Cancer Inst 70:4, 1983
- 81 . Vital istatistics of the United States Volume II, Mortality-part A, DHEW, 1978
- 82 . Greenblatt RB, Stoddard LD. The estrogen-cancer controversy. J Am Geriat Soc 26:1, 1978
- 83 . Lauritzen C: Destrogens and endometrial cancer : a point of view. Clinics Obstet Gynecol 4:145, 1977
- 84 . Creasman WT, Weed JC Jr: Carcinoma of the endometrium : clinical features and management. (In) Coppleson (ed): Gynecologic oncology , second ed. Vol 2, Churchill Livingstone, London, 1992, pp 775
- 85 . Frick HC, Munnell EW, Richart RM, Berger AP, Lawry MF: Carcinoma of the endometrium. Am J Obstet Gynecol 115:663, 1973
- 86 . Jones HW: Treatment of adenocarcinoma of the endometrium Obstet Gynecol Surv 30:147, 1975
- 87 . Creasman WT, Morrow CP, Bundy L et al.: The surgicopathologic spread pattern of endometrial cancer A GOG study. Cancer 60:2035, 1987
- 88 . Rutledge F: The role of radical hysterectomy in adenocarcinoma of the endometrium , Gynecol Oncol 2:331, 1974
- 89 . Homesley HD, Boronow RC, Lewis JL Jr: Stage II endometrial adenocarcinoma , Memorial Hospital for Cancer, 1949-1965. Obstet Gynecol 49:604, 1977
- 90 . Kadar NRD, Kohorn EI, LiVolsi VA, Kapp DS: Histologic variants of cervical involvement by endometrial carcinoma, Obstet Gynecol 59:85, 1982
- 91 . Larson DM, Copeland LJ, Galleger HS: Nature of cervical involvement in endometrial carcinoma, Cancer 59:259, 1987

- 92 . Kottmeier HL: Annual report on the results of treatment in carcinoma of the uterus, vagina and ovary, J Int Fed Gynecol Obstet 15:4,1967
- 93 . Gynecologic Oncology Group, Pathology Manual, Philadelphia, Pa
- 94 . Paulsen HE, Taylor CW: Histological typing of female genital tract tumors . International histological classification of tumors No 13, World Health Organization, Geneva
- 95 . Christopherson WM, Alberhasky RC, Connely PJ: Carcinoma of the endometrium. II. Papillary adenocarcinoma: A clinicopathological study of 46 cases. Am J Clin Pathol 77:534,1982
- 96 . Christopherson WM, Connely PJ, Alberhasky RC: Carcinoma of the endometrium . V. An analysis of prognosticators in patient with favorable subtypes and stage I disease. Cancer 51:1705,1983
- 97 . Cheon HK: Prognosis of endometrial carcinoma , Obstet Gynecol 34:680,1969
- 98 . Boronow RC, Morrow CP, Creasman WT: Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathological findings of a prospective study. Obstet Gynecol 63:825,1984
- 99 . Lutz MH, Underwood PB Jr, Kreutner A Jr, Miller MC: Endometrial carcinoma : A new method of classification of therapeutic and prognostic significance
100. DiSaia PJ, Creasman WT: Adenocarcinoma of the uterus, In DiSaia & Creasman (eds.) Clinical Gynecologic-Oncology, Mosby company, Toronto, 1989, p 176
101. Creasman WT, Rutledge FN: The prognostic value of peritoneal cytology in gynecologic malignant disease. Am J Obstet Gynecol 110:773,1971
102. Yazigi K, Fiver MS, Blumenson L: Malignant peritoneal-cytology as prognostic indicator in stage I endometrial cancer . Obstet Gynecol 62:359,1983
103. Konski A et al.: Absence of prognostic significance , peritoneal dissemination and treatment advantage in endometrial cancer patients with positive peritoneal cytology Int J Radiat Oncol Phys 4:49,1988
104. Szpak CA, Creasman WT, Vollmer RT, Johnston WW: Prognostic value of cytologic examinations of peritoneal washings with endometrial cancer , Acta Cytol 25:640,1981
105. Javert CI: The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on co-existing vascular involvement. Am J Obstet Gynecol 64:780,1952
106. Schink JC, Lurain JR, Wallemark CB, Chmiel JS: Tumor size in endometrial cancer: a prognostic factor for lymph node metastasis , Obstet Gynecol 70:216,1987

107. Chen SS: Extrauterine spread in endometrial carcinoma clinically confined to the uterus. *Gynecol Oncol* 21:23, 1985
108. Silverberg SG, De Giorgi LS: Clear cell carcinoma of the endometrium. *Cancer*, 31:1127, 1973
109. Kurman RJ, Scully RE: Clear cell carcinoma of the endometrium: An analysis of 21 cases. *Cancer* 37:872, 1976
110. Christopherson WM, Alberhasky RC, Connely EC: Carcinoma of the endometrium. I. A clinicopathologic study of clear cell carcinoma and secretory carcinoma. *Cancer* 49:1511 1982
111. Crum CP, Fechner RE: Clear cell adenocarcinoma of the endometrium. A clinicopathologic study of 11 cases. *Am J Diag Gynecol Obstet* 1:261, 1976
112. Photopoulos GJ, Carney CN, Edelman DA, Hughes RR, Fowler WC Jr, Walton LA: Clear cell carcinoma of the endometrium. *Cancer* 43:1448, 1979
113. Hendrickson M, Ross J, Eifel P, Martinez A, Kempson R: Uterine papillary serous carcinoma. A highly malignant form of endometrial adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 6:93, 1982
114. Lauchlan SC: Tubal (serous) carcinoma of the endometrium *Arch Pathol Lab Med* 105:615, 1981
115. Chambers JT, Merino M, Kohorn EI, Peschel RE, Schwartz PE: Uterine papillary serous carcinoma. *Obstet Gynecol* 69:109, 1987
116. Silverberg SG, Bolin MG, De Giorgi LS: Adenoacanthoma and mixed adenosquamous carcinoma of the endometrium. *Cancer* 30:1307, 1972
117. Badib AD, Kurohara SS, Vongtama VV, Selim MA, Webster JH: Biologic behavior of adenoacanthoma of endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 106:205, 1970
118. Salazar OM, DePapp EW, Bonfiglio TA, Freldstein FL, Rubin P, Rudolph JH: Adenosquamous carcinoma of the endometrium. *Cancer* 40:119, 1977
119. Ng ABP, Reagan JW, Wentz WB: Mixed adenosquamous carcinoma of the endometrium. *Am J Clin Pathol* 59:765, 1973
120. Fluhmann CF: Squamous epithelium in the endometrium in benign and malign conditions *Surg Gynecol Obstet* 46:309, 1982
121. White AJ, Buchsbaum HJ, Macasaet MA: Primary squamous cell carcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol* 41:912, 1973
122. Tiltman AJ: Mucinous carcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol* 55:244, 1980
123. Creasman WT et al: Influence of cytoplasmic steroid receptor content on prognosis in early stage endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 151:922, 1985

124. Lindahl B, Alm P, Fernö M, Grundshell H, Norgren A, Trope C: Relapse of endometrial carcinoma related to steroid receptor concentration, staging, histologic grading and myometrial invasion. *Anticancer Res* 6:1317, 1986
125. Geisinger KR, Kute TE, Marshall RB, Homesley HD, Morgan JH: Analysis of relationships of the ploidy and cell cycle kinetics to differentiation and the female sex steroid hormone receptors in adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Clin Pathol* 85:536, 1986
126. Käuppilä A, Janne O, Kuynsuo E, Vihko R: Treatment of advanced combined cytotoxic therapy: Predictive value of cytosol estrogen and progesterone receptor levels. *Cancer* 46:2162, 1980
127. Hanson NB et al: Prognostic significance of lymph vascular space invasion in stage I endometrial cancer. *Cancer* 55:1753, 1985
128. Iversen OE, Laerum OD: Ploidy disturbances in endometrial and ovarian carcinomas: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 7:327, 1985
129. Granberg I, Gupta S, Joelsson I, Sprenger E: Chromosome and nuclear DNA study of a uterine adenocarcinoma and its metastases. *Acta Pathol Microbiol Scand (A)* 82:1, 1974
130. Stanley MA, Kirkland JW: Cytogenetic studies of endometrial carcinoma *Am J Obstet Gynecol* 102:1070, 1968
131. Iversen OE, Utaaker E, Skaarland E: DNA ploidy and steroid receptors as predictors of disease course in patients with endometrial carcinoma *Acta Obstet Gynecol Scand* 67:531, 1988
132. Mayall BH, Casperson TO: Curriculum vitae and selected publications. *Cytometry* 5:314, 1984
133. Kamensky LA, Derman H, Melamed MR: Ultraviolet absorption of epidermoid cancer cells. *Science* 142:1580, 1963
134. Kamensky LA, Melamed MR: Spectrophotometric cell sorter *Science* 156:1364, 1967
135. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630, 1965
136. Melamed MR, Mullaney PR, Mendelsohn ML: *Flow cytometry and sorting*, New York, Wiley, 1979.
137. Shapiro HM: *Practical flow cytometry*, New York, Liss, 1985
138. Traganos F: *Flow cytometry. Principles and applications. II.* *Cancer invest* 2:239, 1984.
139. Ensley JF, Maciorowski Z, Pietraszkiewski H et al: Solid tumor preparation for clinical application of flow cytometry. *Cytometry*. 8:488, 1987
140. Thornwaite JT, Sugarbaker EV, Temple WJ: Preparation of tissues for DNA flow cytometric analysis. *Cytometry* 1:229, 1980

141. Blobel G, Potter VR: Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154:1662, 1966
142. Koss LG, Wolley RC, Schreiber K et al: Flow microfluorometric analysis of nuclei isolated from various normal and malignant human epithelial cells *J Histochem Cytochem* 25:565, 1977
143. Wolley RC, Schreiber K, Koss LG et al: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour *JNCI* 69:15, 1982
144. Krishnan A: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66:180, 1975
145. Vindelev LL, Christiensen IJ, Nissen NI: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis *Cytometry* 3:323, 1983
146. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31:1333, 1983
147. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW et al: DNA flow cytometry of paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 5:660, 1984
148. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6:327, 1985
149. Coon JS, Landay AL, Weinstein WS: Flow cytometric analysis of paraffin-embedded tumors: implications for diagnostic pathology. *Hum Pathol* 17:435, 1986
150. Coon JS, Deitch AD, DeVere White RW et al: Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. The National Cancer Institute's flow cytometry network experience. *Cancer* 61:126, 1988
151. Cohen JHM, Aubrey JP, Banchereau J et al: Identification of cell subpopulations by dual-color surface immunofluorescence using biotinylated and unlabeled monoclonal antibodies. *Cytometry* 9:303, 1988
152. Moran PK, Slezak SE, Poste G: Improved flow cytometric analysis of leucocyte subsets: Simultaneous identification of five cell subsets using two-color immunofluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8361, 1986
153. Thorwaite JF, Seckinger D, Sugarbaker EV et al: Dual immunofluorescent analysis of human peripheral blood lymphocytes *Am J Clin Pathol* 82:48, 1984
154. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kapunscinski J et al: Accessibility of DNA in situ various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* 5:355, 1984

155. Darzynkiewicz Z: Metabolic and kinetic compartments of the cell cycle distinguished by multiparameter flow cytometry, in Skehan P, Friedman SJ (eds): Growth, Cancer and the Cell Cycle. Clifton NJ, Humana 1984, pp 249-278
156. Hiddemann W, Schumann J, Anderuff M et al: Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cancer Genet Cytogenet 13:181, 1984
157. Wolley RC, Herz F, Koss LG: Caution on the use of lymphocytes as standards in the flow cytometric analysis of cultured cells. Cytometry 2:370, 1982
158. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kimmel M: Assay of cell cycle kinetics by multivariate flow cytometry using the principles of stathmokinetics, in Gray JE, Darzynkiewicz Z (eds): Techniques of cell cycle analysis, Clifton NJ, Humana, 1986, pp 291-336.
159. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Melamed MR: New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry Cytometry 1:95, 1980
160. Darzynkiewicz Z, Driemann H, Traganos F et al: Cell heterogeneity during the cell cycle. J Cell Physiol 113:463, 1982
161. Darzynkiewicz Z: Molecular interactions and cellular changes during the cell cycle. Pharmacol Ther 21:1-43, 1983
162. Barlogie B, Stass S, Dixon D et al: DNA aneuploidy in adult acute leukemia. Cancer Genet Cytogenet 28:2-13, 1987
163. Coon JS, Schwartz D, Summers JL et al: Flow cytometric analysis of deparaffinized nuclei in urinary bladder carcinoma. Comparison with cytogenetic analysis. Cancer 57:1594, 1986
164. Frankfurt OS, Arbuck SG, Chin JL et al: Prognostic application of DNA flow cytometry for human solid tumors. Ann NY Acad Sci 468:276, 1986
165. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL: Flow cytometry, cellular DNA content and prognosis in human malignancy. J Clin Oncol 5:1690, 1987
166. Wersto RP, Greenebaum E, Deitsch D et al: Deoxyribonucleic acid ploidy and cell cycle events in benign colonic epithelium peripheral to carcinoma. Lab Invest 58:218, 1988
167. Devonec M, Darzynkiewicz Z, Kostyrka-Claps ML et al: Flow cytometry of low stage bladder tumors: Correlation with cytologic and cystoscopic diagnosis. Cancer 49:109, 1982
168. Klein FA, Herr HW, Sogani PC et al: Detection and follow-up carcinomas of the urinary bladder by flow cytometry. Cancer 50:389, 1982

169. deVere White RW, Olsson CA, Deitsch AD: Flow cytometry: Role in monitoring transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 28:15, 1986
170. Murphy WM, Emerson LD, Chandler RW et al: Flow cytometry versus urinary cytology in the evaluation of patients with bladder cancer. *J Urol* 136:815, 1986
171. Koss LG, Wersto RP, Simmons DH et al: Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of flow cytometry, image cytophotometry and cytology of voided urine in patients with past history of urothelial tumors. *Cancer* (in press)
172. Schneller J, Eppich E, Greenebaum E et al: Flow cytometry and Feulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 59:1307, 1987
173. Mendecki J, Dillmann WH, Wolley RC et al: Effect of thyroid hormone on the ploidy of rat liver nuclei as determined by flow cytometry. *Proc Soc Exp Biol Med* 158:62, 1978
174. Fossa SD, Thorud E, Vaage S et al: DNA cytometry of primary breast cancer. Comparison of microspectrophotometry and flow cytometry and different preparation methods for flow cytometric measurements. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 91:235, 1983
175. Johnston DA, White RA, Barlogie B: Automatic processing and interpretation of DNA distributions. Comparison of several techniques. *Comput Biomed Res* 11:393, 1978
176. Baisch E, Göhde W, Linden WA: Analysis of PCP data to determine the fraction of cells in the various phases of the cell cycle. *Radiat Environ Biophys* 12:31, 1975
177. Haag D, Feichter G, Coerttler K et al: Influence of systematic errors on the evaluation of the S phase portions from DNA distributions of solid tumors as shown for 320 breast carcinomas. *Cytometry* 8:377, 1987
178. Holdrinet RSG, Pennings A, Doenthe-Schonk AM et al: Flow cytometric determination of the S phase compartment in adult acute leukemia. *Acta Haematol (Basel)* 70:369, 1985
179. Christensson B, Tribukait B, Linder IL et al: Cell proliferation and DNA content in non-Hodgkin's lymphoma. Flow cytometry in relation to lymphoma classification. *Cancer* 58:1295, 1986
180. Frankfurt OS, Greco WR, Slocum HK et al: Proliferative characteristics of primary and metastatic human solid tumors by DNA flow cytometry. *Cytometry* 5:629, 1984
181. Valm M, Mattern J, Muller T et al: Flow cytometry of epidermoid carcinomas: Relationship of ploidy and cell cycle phases to survival. A five year follow-up study. *Anticancer Res* 8:105, 1988

182. Nervi C, Badaracco G, Morrelli M et al: Cytokinetic evaluation in human head and neck cancer by autoradiography and DNA cytofluorometry. *Cancer* 45:452, 1980
183. Hedley DW, Rugg C, Gelber RD: Association of DNA index and S phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 47:4729, 1987
184. Hiddemann W, Schumann I, Andreeff M, Barlogie B, Herman C, Leif R, Mayall B, Murphy R, and Sandberg A: Convention of nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5:445, 1984
185. Lindahl B, Alm P, Killander D, Langstrom E, Trope C: Flow cytometric DNA analysis of normal and cancerous human endometrium and cytological-histopathological correlations. *Anticancer Research* 7:781, 1987
186. Nahhas WA, Zaino R, Mortel R: Residual carcinoma in the surgical specimen of patients with endometrial adenocarcinoma undergoing preoperative radiation therapy A study of 80 patients and a literature review. *Gynecol Oncol* 18(2):165, 1984.
187. Wagenius G, Strang P, Boman K, Tribukait B, Stendahl U: Residual myometrial invasion after intracavitary irradiation of endometrial adenocarcinoma stages I and II. Relations to DNA content and S-phase rate. *In vivo* 2:243, 1988