

## Pretočna in slikovna citometrija - novi kvantitativni metodi

Marija Us-Krašovec

### ZAKAJ POTREBUJEMO NOVE METODE?

Sodobno zdravljenje malignih neoplazem je zasnovano na visoko specializiranih terapevtskih protokolih in je uspešnejše kot v preteklosti. Če hoče klinik izbrati ustrezno terapevtsko shemo in ustrezen citostatik, mora patolog tumor čim natančneje opredeliti. S klasično mikroskopsko preiskavo razvrstimo tumorje v benigne, mejno maligne in maligne, opredelimo fenotip, stopnjo diferenciacije in pri nekaterih tumorjih še dodatne morfološke posebnosti, s katerimi ocenjujemo prognozo bolezni. Nekateri tumorji, npr. slabo diferencirani karcinomi, nekateri sarkomi, maligni limfomi, otroški tumorji in maligni melanom, nimajo vedno morfoloških značilnosti, po katerih bi jih lahko fenotipsko razvrstili. Pri preiskavi teh tumorjev potrebujemo dopolnilne metode. Elektronska mikroskopija in panel imunokemičnih označevalcev nam pomagata, da jih opredelimo vsaj fenotipsko.

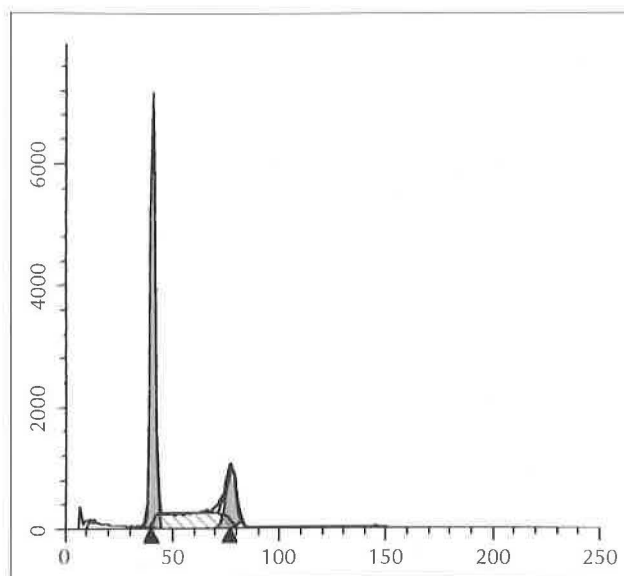
Z znanimi napovednim dejavniki, bodisi kliničnimi ali morfološki, poteka bolezni ne moremo vedno zanesljivo opredeliti. Klinično-patološke raziskave so pokazale, da tudi stopnja diferenciacije tumorja ne sovпада vedno s hitrostjo in načinom rasti tumorja in z njegovim metastatskim potencialom. Tudi ob vseh ugodnih kliničnih in patoloških parametrih poteka bolezni včasih agresivno.

Potreba po natančni identifikaciji prognostično različnih tumorjev in njihovih podskupin ter iskanje novih objektivnih napovednih dejavnikov sta v veliki meri botrovala razvoju dveh novih kvantitativnih metod - pretočni (PCM) in slikovni (SCM) citometriji.

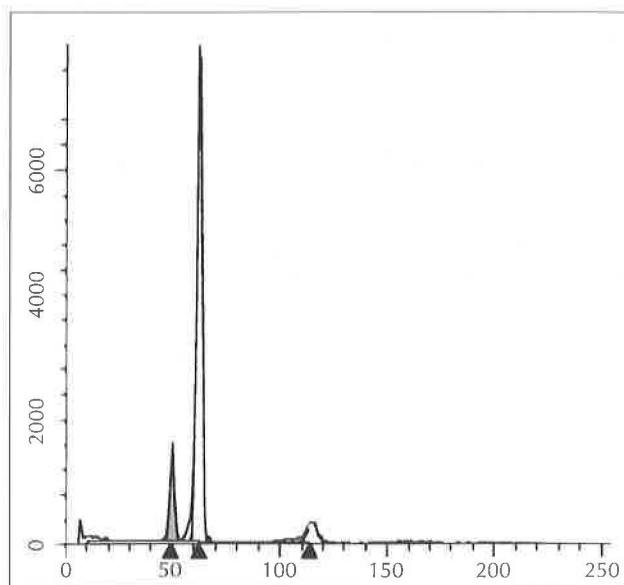
### PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočni citometer je kompleksna naprava, sestavljena iz optičnega dela z izvorom svetlobe in filtri, sistema za pretok tekočin, elektronskega dela in računalnika. Meritve temeljijo na principu fluorescenc. S PCM analiziramo številne strukturne in funkcijske lastnosti posamezne celice ali njenih delov. Metoda je dokaj enostavna, hitra, natančna in posreduje objektivne meritve. Analiziramo suspendirane in s fluorokromom obarvane celice, ki polzijo s pomočjo pretočnega sistema v nizu, druga za drugo mimo izvora svetlobe. Fluorokrom pri tem absorbira svetlobo in elektroni barvila preidejo na višji energetski nivo. Ob prehodu v osnovno stanje odda barvilo kvant svetlobe, ki ima daljšo valovno dolžino kot žarek, ki je vzbudil fluorokrom. Fotodetektorji zberejo oddano svetlobo in jo spremenijo v električne signale, ki jih nato samo še digitaliziramo, računalniško obdelamo in grafično prikažemo.

Najpomembnejša strukturna značilnost celice, ki jo merimo s PCM, je vsebnost DNA (ploidija), saj domnevamo, da je



Slika 1. Histogram diploidnega tumorja s 25,9% deležem celic v fazi S.



Slika 2. Histogram aneuploidnega tumorja z  $DI = 1,25$  in 3,37% celic v fazi S.

ključna lastnost malignega procesa kvantitativna sprememba kromosomov. Maligna celica ima več, redkeje manj, kromosomov kot normalna somatska celica s 23 parnimi kromosomi. Normalno število kromosomov v somatski celici imenujemo diploidno in ga označimo z  $2n$  (ali z  $2c$ ). Vrednost DNA, ki ustreza parnemu številu kromosomov, je evploidna (diploidna). Vrednosti, ki so večje ali manjše od  $2n$ , so aneuploidne, torej v prvem primeru hiperdiploidne in v drugem primeru hipodiploidne. Količino DNA v tumorskih celicah prikažemo ponavadi grafično v obliki frekvenčnega histograma. Vrednost DNA izrazimo z indeksom DNA, ki kaže relativno stopnjo odklona od normalne vsebnosti DNA; po definiciji je indeks DNA diploidnih celic 1. Iz histograma lahko ugotovimo tudi delež celic v posameznih fazah celičnega ciklusa. Tako lahko ocenjujemo proliferativno aktivnost tumorja, ki jo odraža odstotek celic v fazi S (slika 1, 2).

V obsežnih retrospektivnih in prospektivnih raziskavah smo skušali ugotoviti, ali je agresivnost bolezni v povezavi z vsebnostjo DNA v tumorju. Ugotovili smo, da lahko razvrstimo tumorje v tri kategorije:

1. v skupino s statistično značilno soodvisnostjo med vsebnostjo DNA in agresivnostjo,
2. v skupino brez soodvisnosti in
3. v skupino, kjer je soodvisnost nakazana.

Med tumorje z nakazano soodvisnostjo sodi karcinom dojke. Kljub številnim in obsežnim raziskavam ni uspelo trdno dokazati povezave med DNA ploidijsko in proliferativno aktivnostjo tumorja ter potekom bolezni. V naši pred kratkim zaključeni prospektivni študiji, ki je zajela več kot 300 bolnic z rakom dojke, smo ugotovili, da sta tako interval brez bolezni kot preživetje statistično značilno povezana z DNA ploidijsko, ki je bila poleg prizadetosti pazdušnih bezgavk, velikosti tumorja in njegove histološke stopnje malignosti neodvisen napovedni dejavnik. Upamo, da bodo novejša kombinirane raziskave DNA ploidijske in analize celičnih antigenov še natančneje in da bodo potrdile naše ugotovitve.

### KAKŠNE SO PERSPEKTIVE PCM?

V novejšem času raste zanimanje raziskovalcev za PCM analize drugih strukturnih in funkcijskih lastnosti maligne celice. Vse številnejše so PCM analize citoplazemskih in jedrnih antigenov. Zlasti pomembni so antigeni, s katerimi lahko opredelimo limfome in levkemije. Maligni limfomi so trd oreh v vsakodnevni patologovi praksi. Kljub uporabi številnih specifičnih imunokemičnih označevalcev pogosto ni mogoče opredeliti vrste monoklonske proliferacije in tipa malignega limfoma. PCM imunofluorescenčna analiza, s katero kvantitativno opredelimo celično populacijo, deleže posameznih vrst celic v heterogeni populaciji in spremembe v ekspresiji antigenov med boleznijo in zdravljenjem, je zahtevnejša od meritve DNA, vendar je hitra in ni odvisna od subjektivne interpretacije imunskih reakcij.

Za klinično onkologijo je pomembna tudi možnost določevanja in kvantificiranja hormonskih receptorjev, ki so pri raku dojke pomemben napovedni dejavnik.

S PCM poskušajo raziskovalci analizirati tudi parametre

tumorske populacije, za katere domnevajo, da utegnejo poglobiti znanje o naravi maligne bolezni, razložiti fenomen apoptoze ter pojav prirojene ali pridobljene odpornosti na citostatike.

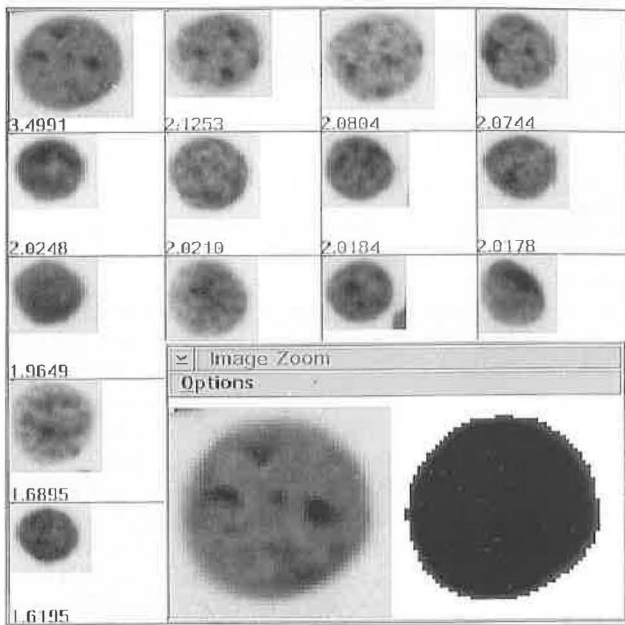
### SLIKOVNA CITOMETRIJA

Za slikovno citometrijo je več sistemov. Večinoma so polavtomatski, saj moramo sami ročno izbirati objekte za preiskavo. Izpopolnjen, povsem avtomatiziran slikovni citometer je razvila šele v začetku devetdesetih let skupina strokovnjakov v Britanski Kolumbiji. Sodobni SCM sestavljajo svetlobni mikroskop z motorizirano objektivo, robotska roka za nalaganje stekelc na objektivo, izvor svetlobe z enoto za energetska napajanje, raziskovalna CCD kamera in računalnik z ustreznimi kontrolorji. Najpomembnejši del sistema je CCD kamera z visoko prostorsko in svetlobno ločljivostjo. Opremljena je s približno 1.400.000 senzorji. Vsak senzor je  $6.8 \times 6.8 \mu\text{m}$  velik kvadrat, ki zazna in zajame svetlobo po vsej površini. Pri objektivu z 20-kratno povečavo pokrije vsak senzor približno  $0.1 \mu\text{m}^2$  jedrne površine, kar je na meji očesne ločljivosti. Z gosto mrežo (1035 vrstic s po 1348 senzorji) zajamemo in natančno posnamemo vso površino jedra. Analiziramo celice, ki so v enem sloju nanešene na objektivo stekelce, fiksirane in obarvane po Feulgenovi metodi z barvilom, ki se stehiometrično veže na DNA. Ker so jedra celic stehiometrično obarvana, je količina svetlobe, ki jo jedro prepusti in kamera zajame, obratno sorazmerna s količino DNA. Zajete svetlobne signale digitaliziramo in prenesemo v računalnik, ki izračuna številne jedrne karakteristike. Tako s SCM v vsaki celici istočasno analiziramo vsebnost DNA, morfolometrične lastnosti (velikost, obliko in mnoge druge) in jedrne značilke, ki opisujejo razporeditev kromatina v jedru. Delovanje celega sistema usklajuje programska oprema.

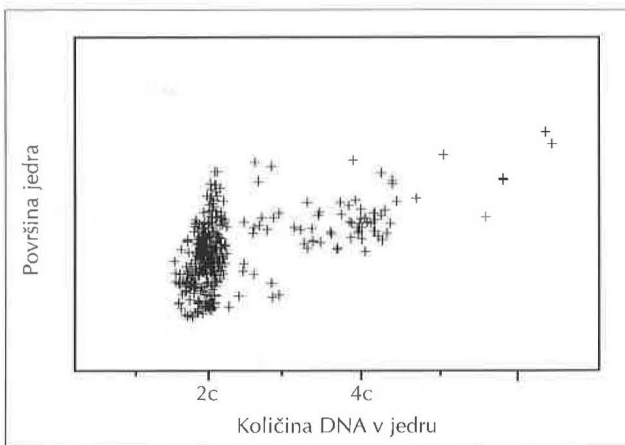
Prednost SCM je v tem, da na računalniškem zaslonu vidimo vsak izmerjeni objekt. Tako lahko identificiramo posamezna jedra, ki imajo več kot  $5c$  DNA (t.i.  $>5c$  exceeding rate). Ker je takih jeder malo, jih PCM ne more prikazati (slika 3,4). Dosedanje SCM študije so večinoma potrdile izsledke PCM raziskav, da imajo tumorji z diploidno vrednostjo DNA praviloma boljšo prognozo. Ugotovile pa so tudi, da imajo tumorji s celicami, ki vsebujejo  $>5c$  DNA, slabšo prognozo. Celice z  $>5c$  DNA so našli tudi v tumorjih z dominantno diploidno populacijo. Te celice naj bi bile razlog za agresivnejši potek bolezni pri nekaterih diploidnih tumorjih.

V primerjavi s PCM je velika prednost SCM ta, da lahko istočasno analiziramo fotometrične, morfolometrične in jedrne značilke, ki prikazujejo razporeditev kromatina. Če je predpostavka, da je rak bolezen organizacije DNA, pravilna, upravičeno domnevamo, da bomo dobili objektivne kazalce biološke narave tumorja predvsem z analizo jedrnih značilk.

SCM študij je malo. Večinoma nakazujejo možnost uporabe jedrnih značilk pri detekciji, oceni biološkega potenciala prekancerov, oceni agresivnosti tumorja, prognozi in oceni učinka zdravljenja.



**Slika 3.** Galerija slik jeder, ki jih je nabral in analiziral slikovni citometer.



**Slika 4.** Razsevni diagram prikazuje vrednosti DNA in velikost izmerjenih jeder. Nekaj jeder je v območju >5c DNA.

Zanimiva hipoteza, da bi lahko s SCM odkrili bolezen še v predkliničnem stadiju, sloni na ugotovitvi, da se nekatere jedrne značilke normalnih celic oseb z rakom razlikujejo od normalnih celic zdravih oseb. Te subtilne, očesu nedostopne spremembe v razporeditvi jedrnega kromatina normalnih celic v bližnji ali bolj oddaljeni okolici tumorja so poimenovali MAC - "malignancy associated changes" (spremembe, ki spremljajo malignom). Prisotnost MAC so našli na normalnih celicah ob istočasnem karcinomu dojke, pljuč, ščitnice in materničnega vratu. V našem laboratoriju za SCM smo analizirali MAC na celicah bukalne sluznice bolnikov z rakom na pljučih. Ugotovili smo, da jedrne značilke s 70-80% zanesljivostjo ločijo kontrolno skupino zdravih prostovoljcev od skupine bolnikov z rakom pljuč.

V onkologiji so poseben problem epitelijske displazije in hiperplazije, t.i. prekanceroze. Z mikroskopsko preiskavo ne moremo zanesljivo ugotoviti, katera od teh sprememb se bo razvila v karcinom in katera ne. Zato še vedno zdravimo vse enako. Dosedanje SCM študije arhiviranih razmazov displazij so pokazale, da vrednosti jedrnih značilk progresivnih displazij in displazij, ki so regresivne, niso enake. V letos objavljeni študiji so ugotovili, da lahko jedrne značilke s 93% zanesljivostjo ločujejo med progresivnimi in regresivnimi displazijami. Da utegnejo biti jedrne značilke napovedni kazalec poteka bolezni, je pokazala študija, ki je analizirala jedrne značilke bolnikov s T1 adenokarcinomom pljuč. Po operativnem zdravljenju karcinoma so pravilno napovedali petletno preživetje v 81%. Zanimiva je študija, v kateri so z analizo jedrnih značilk ločevali med skupinama bolnikov s karcinomom prostate z različno odzivnostjo na hormonsko terapijo.