

Η Διεγχειρητική Κυτταρομετρία Ροής (Intraoperative Flow Cytometry- iFC) στον ακριβή χαρακτηρισμό καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης. Μια μελέτη 102 ασθενών.

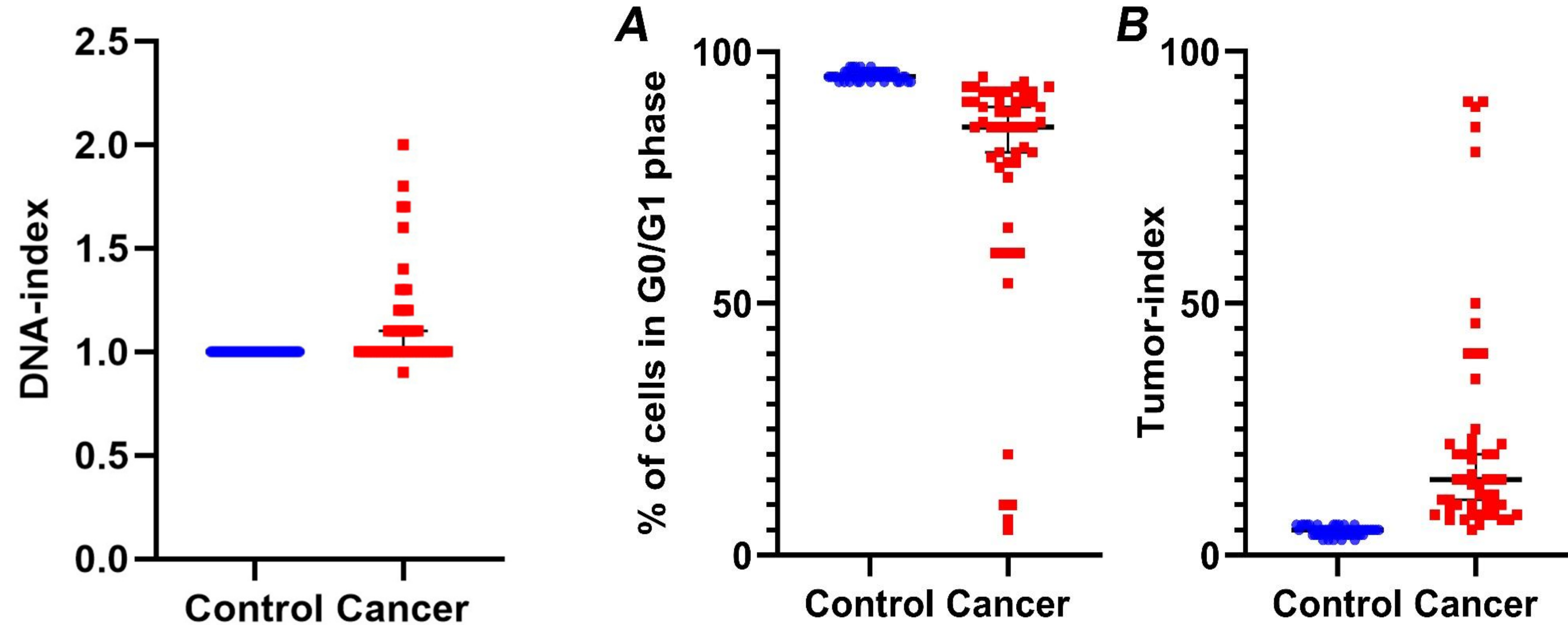
Παλιούρας Αθανάσιος¹, Μαρκόπουλος Γεώργιος², Δούβλη Ερρικέτη¹, Χριστοδούλου Παύλος¹, Καλόσακα Εμμανουέλα¹, Δάκος Τριαντάφυλλος¹, Ζαχαρίου Αθανάσιος¹, Τσαμπαλάς Σταύρος¹, Μπαλτογιάννης Δημήτριος¹, Λάμπρη Ευαγγελία³, Σοφικίτης Νικόλαος¹, Βαρθολομάτος Γεώργιος²

¹ Ουρολογική Κλινική ΠΓΝ Ιωαννίνων, ² Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα Μοριακής Βιολογίας και Μεταφραστικής Κυτταρομετρίας Ροής ΠΓΝ Ιωαννίνων, ³ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής-Κυτταρολογίας ΠΓΝ Ιωαννίνων

Εισαγωγή / Σκοπός: Η ακριβής σταδιοποίηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης δεν είναι πάντα εύκολη, ενώ και η εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης είναι σε μεγάλο βαθμό υποκειμενική. Αυτοί είναι οι βασικοί λόγοι της έρευνας για περισσότερους αντικειμενικούς παράγοντες αξιολόγησης της καρκινικής συμπεριφοράς. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περιγραφή της αξίας της διεγχειρητικής κυτταρομετρίας ροής (Intraoperative Flow Cytometry- iFC) για τον διαχωρισμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.

Υλικά και Μέθοδοι: Σε ένα πληθυσμό 102 ασθενών οι οποίοι υπεβλήθησαν σε διουρηθρική εκτομή όγκου ουροδόχου κύστης υπολογίστηκε διεγχειρητικά ο δείκτης DNA (DNA Index, DI=DNA tumor cells (Geo Mean G0/G1) / DNA control cells (Geo Mean G0/G1) και ο δείκτης κακοήθειας (Tumor Index, TI=S-phase + G2/M). Έγινε συγκριτική μελέτη δειγμάτων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από τον ίδιο ασθενή και τα κυτταρομετρικά δεδομένα ελέγχθηκαν και ιστολογικά ως προς την ακρίβεια τους.

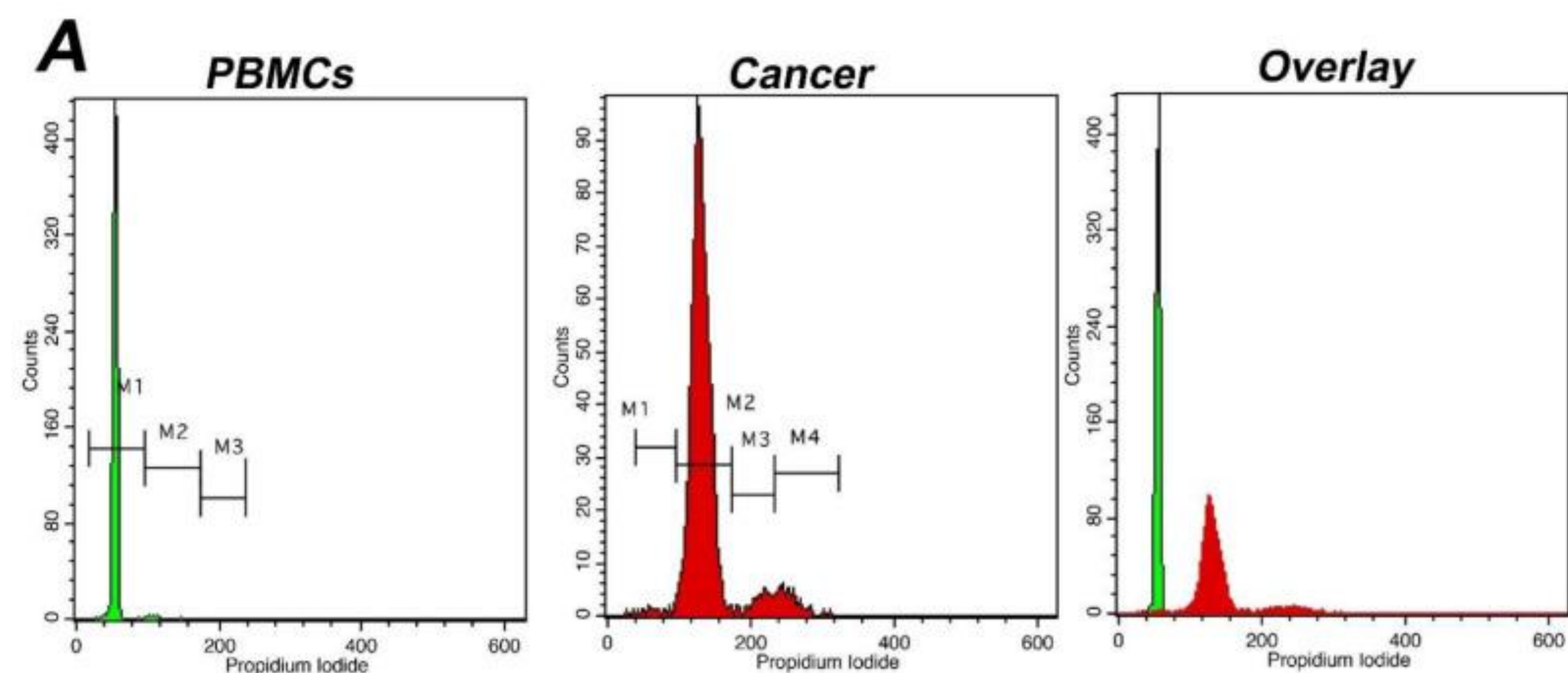
Αποτελέσματα: Σε 55 περιπτώσεις τα δείγματα ήταν διπλοειδή (54%) και τα υπόλοιπα ανευπλοειδή 47 (46%). Τα ανευπλοειδή δείγματα χωρίστηκαν περαιτέρω σε: 43 υπερπλοειδή (DI→ 1,07–2,2) και 4 υποπλοειδή (DI=0,9). Η ανάλυση των δεδομένων αποκαλύπτει ότι το κλάσμα της φάσης G0/G1 στις περιπτώσεις του καρκίνου είναι σημαντικά χαμηλότερο ($p < 0,01$) από αυτό των φυσιολογικών. Ενώ ο TI είναι σημαντικά υψηλότερος ($p < 0,01$) στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα, ο mean Tumor-index σε φυσιολογικό ιστό είναι $4,47 \pm 0,12$ (mean value $\pm$ standard error), ενώ σε δείγματα όγκου είναι $15,86 \pm 2,85$ αντίστοιχα. Αποδεικνύοντας ότι ο TI αποτελεί έναν αξιόπιστο διεγχειρητικό δείκτη διάκρισης φυσιολογικού και νεοπλασματικού ιστού.



Εικόνα 2. Ο δείκτης DNA αντιπροσωπεύει την ανευπλοειδία των καρκινικών κυττάρων. Οι τιμές του δείκτη DNA έχουν ποσοτικοποιηθεί με τη μεθοδολογία της iFC και σχεδιάστηκαν γραφικά, αντιπροσωπεύοντας τα φυσιολογικά κύτταρα (μπλε κουκκίδες) και τα καρκινικά κύτταρα (κόκκινα σημεία) σε μεμονωμένα δείγματα ασθενών, αντίστοιχα. Τα φυσιολογικά κύτταρα (που λαμβάνονται από τον φυσιολογικό ιστό της ουροδόχου κύστης) είναι διπλοειδή (DNA Index=1). Συμπερασματικά ένας δείκτης DNA $\neq 1$ είναι ένα κοινό, μοναδικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων.

Εικόνα 3. (Α) ποσοστό των κυττάρων στη φάση G0/G1 και (Β) δείκτης κακοήθειας σε δείγματα φυσιολογικού έναντι καρκινικού ιστού, με βάση τη μεθοδολογία της iFC. Τα φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα παρουσιάζονται ως μπλε και κόκκινες κουκκίδες, αντίστοιχα. Οι μαύρες οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεσο σε κάθε ομάδα. (Α) Τα δείγματα του όγκου παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό στη φάση G0/G1 από τον φυσιολογικό ιστό της ουροδόχου κύστης. (Β) Αντίστροφα, ένας σημαντικά υψηλότερος δείκτης κακοήθειας (το αθροιστικό κυτταρικό κλάσμα των φάσεων S και G2/M) είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων.

Συμπεράσματα: Το πρωτόκολλο της iFC που ακολουθήσαμε κατά τη διουρηθρική εκτομή είναι μια ακριβής μεθοδολογία για την ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων σε ένα δεδομένο δείγμα ιστού του ασθενούς.



Εικόνα 1. Ανάλυση αντιπροσωπευτικού ανευπλοειδούς όγκου με υψηλό δείκτη DNA. (Α) Ιστογράμματα ανάλυσης DNA και της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος / PBMCs (αριστερό πλαίσιο) κύτταρα ελέγχου και κύτταρα όγκου που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης (μεσαίο πλαίσιο) έγινε χρώση με ιωδιούχο προπύδιο, για τον προσδιορισμό του DNA. Αλληλοεπικάλυψη των ιστογραμμάτων (δεξιό πλαίσιο). Τα ιστογράμματα διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας 3 οριοθετημένες περιοχές, με αντίστοιχους δείκτες (M1, M2 και M3), στα κύτταρα PBMC, που αντιστοιχούν σε κύτταρα που βρίσκονται στις φάσεις G1, S, G2/M, αντίστοιχα, με βάση τη μέση ένταση φθορισμού. Τα κύτταρα στη φάση G2/M εκπέμπουν μια διπλή μέση ένταση φθορισμού από αυτή των κυττάρων στη φάση G1, ενώ τα κύτταρα στη φάση S (φάση αντιγραφής του DNA) χαρακτηρίζονται από μια ενδιάμεση ένταση φθορισμού. Στο δείγμα του όγκου, η κορυφή G0/G1 συνέπεσε με τον δείκτη M2 του δείγματος ελέγχου λόγω ανευπλοειδίας. Λόγω αυτού, εισήχθη ένας πρόσθετος δείκτης, ο M4 και σε αυτή την περίπτωση, οι δείκτες M2, M3 και M4 αντιπροσωπεύουν τις φάσεις G1, S, G2/M, αντίστοιχα των καρκινικών κυττάρων. Ο δείκτης DNA υπολογίστηκε σε 1,7. (Β) Παθολογοανατομική αξιολόγηση. Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, χαμηλού βαθμού, μετά από χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης. Αρχική μεγέθυνση $\times 40$ (αριστερά) και $\times 100$ (δεξιά).

