

Η σημασία της πλοειδίας του DNA στην πρόγνωση των νεοπλασμάτων

N. Καπράνος, Α. Κοντογιάννη, Ε. Καραντάση

Prognostic significance of DNA ploidy in human neoplasms

N. Kapranos, E. Kontogiannis, H. Karantasis

Dpt of Pathology, Division of Molecular Pathology, Amalia Fleming Hospital, Athens, Greece

In modern pathology is recognized the importance of more accurate information regarding the biologic behavior and prognosis of the neoplasms. Genetic changes are the basic characteristics of the multistep process of carcinogenesis which comprise complex gene and chromosomal abnormalities. Flow cytometry and image analysis of system are the two basic cytophotometric techniques for the quantitative analysis of cellular DNA content which is expressed as DNA ploidy. Using these cytophotometric systems a lot of studies have been performed assessing the value of cellular DNA content alterations for the biologic behavior of the various human tumors. In this paper the most important findings of the medical literature for almost every human tumor type is reviewed, with special emphasis on the impact of DNA ploidy for patient prognosis.

Key words: *Cytophotometry, DNA ploidy, flow cytometry, Image analysis system, neoplasms, prognosis.*

Στη σύγχρονη παθολογική ανατομική και ογκολογία αναγνωρίζεται συνεχώς η ανάγκη για περισσότερες και ακριβέστερες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία και πρόγνωση των νεοπλασμάτων. Οι διαταραχές του DNA αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης και περιλαμβάνουν περίπλοκες γονιδιακές και χρωματοσωματικές μεταβολές. Η κυτταρομετρία ροής και το σύστημα ανάλυσης εικόνας αποτελούν τις δύο βασικές κυτταροφωτομετρικές τεχνικές για την ποσοτική ανάλυση του κυτταρικού DNA που εκφράζεται ως πλοειδία του DNA. Με τη βοήθεια των κυτταροφωτομετρικών αυτών συστημάτων έχουν γίνει πολλές μελέτες νεοπλασμάτων διαφόρων τύπων και οργάνων και έχει αναλυθεί η σημασία των διαταραχών του κυτταρικού DNA για τη βιολογική συμπεριφορά

τους. Στο άρθρο αυτό γίνεται ανασκόπηση των σημαντικότερων ευρημάτων της διεθνούς βιβλιογραφίας για το σύνολο σχεδόν των νεοπλασμάτων του ανδρώπινου οργανισμού, με ιδιαίτερη έμφαση στη σημασία της πλοειδίας του DNA αναφορικά με την πρόγνωση.

Λέξεις κλειδιά: Κυτταροφωτομετρία, πλοειδία DNA, κυτταρομετρία ροής, σύστημα ανάλυσης εικόνας, πρόγνωση νεοπλασμάτων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη σύγχρονη παθολογική ανατομική και ογκολογία αναγνωρίζεται συνεχώς η ανάγκη για περισσότερες και ακριβέστερες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων και ειδικότερα με τον τρόπο και τον ρυθμό πολλαπλασιασμό τους, τη βιοχημεία τους και τις επιδράσεις τους από τον υπόλοιπο οργανισμό (υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης, αυξητικών παραγόντων) και τον τύπο και την κατανομή του γενετικού υλικού. Οι διαταραχές του DNA αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης και περιλαμβάνουν ειδικές γονιδιακές αυξήσεις ή απώλειες καθώς και χρωματοσωματικές, δομικές και αριθμητικές, διαταραχές¹. Η προσπάθεια μελέτης των διαταραχών του γενετικού υλικού των νεοπλασματικών κυττάρων οδήγησε στην ανάπτυξη δύο βασικών τεχνικών ανάλυσης, της κυτταρογενετικής και της κυτταροφωτομετρίας. Η κυτταρογενετική με τη βοήθεια φθορίζοντος αλλά και χρωμογόνου σήμερα *in situ* υβριδισμού (FISH, CISH) παρέχει ποιοτικής φύσεως πληροφορίες όσον αφορά το είδος της δομικής ή αριθμητικής χρωματοσωματικής διαταραχής σε κύτταρα μετάφασης ή μεσόφασης^{2,3}. Η κυτταροφωτομετρία του DNA αποτελεί μια ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού των μεταβολών του συνολικού κυτταρικού DNA με τη βοήθεια συστημάτων ανάλυσης που βασίζονται στη σχέση μεταξύ εκλεκτικής απορρόφησης ή εκπομπής οπτικών κυμάτων και πυκνότητας διαφόρων ουσιών σε κύτταρα ή ιστούς⁴.

Συστήματα κυτταροφωτομετρίας

Τα συστήματα κυτταροφωτομετρίας, τα οποία αναλύουν τα δεδομένα με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών εφοδιασμένων με το κατάλληλο λογισμικό, είναι δύο ειδών. Το σύστημα **κυτταρομετρίας ροής (Flow Cyto-**

metry), στο οποίο τα κύτταρα εξετάζονται υπό μορφή εναιωρήματος, αφού προηγουμένως έχουν σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική. Στην συνέχεια, ενώ ρέουν σε μονοκύτταρη στήλη, διεγείρονται από ακτίνες LASER, με αποτέλεσμα να εκπέμπουν διαφόρων εντάσεων φθορίζουσα ακτινοβολία, η οποία προσλαμβάνεται από ειδικό οπτικό μετρητή και αναλύεται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η υψηλή ταχύτητα επεξεργασίας μεγάλου αριθμού κυττάρων που φθάνει μέχρι 10.000 κυττάρων/sec. Σημαντικό μειονέκτημα του συστήματος είναι ότι η όλη διαδικασία επιτελείται "τυφλά" χωρίς την παρέμβαση του εξεταζόντος. **Το στατικό σύστημα ή σύστημα ανάλυσης εικόνας (Image Analysis System)** εξετάζει τα κύτταρα υπό μορφή επιχρίσματος μετά από χρώση Feulgen, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου συνδεδεμένου μέσω βιντεοκάμερας με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αν και ο αριθμός των κυττάρων που αναλύεται με το σύστημα αυτό είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με το σύστημα ροής, η δυνατότητα ελέγχου των αναλυομένων κυττάρων από τον εξεταστή ιατρό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα του στατικού συστήματος^{4,6}.

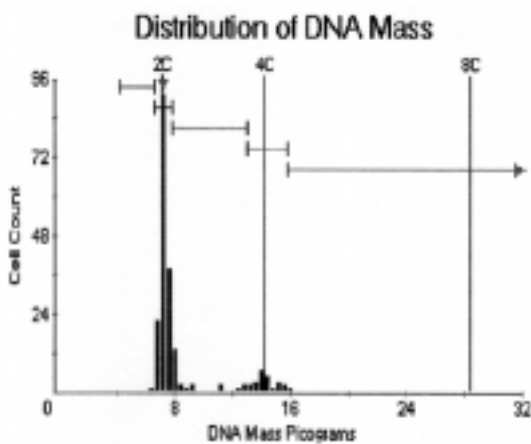
Η διαδικασία της μέτρησης των κυττάρων μέσω οπτικών κυμάτων βασίζεται στο νόμο των Lambert-Beer. Σύμφωνα με το νόμο αυτό η ένταση του απορροφώμενου ή εκπεμπόμενου φωτός σε ορισμένη μάζα ιστού είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των βιολογικών ουσιών, εφόσον όλες οι άλλες παράμετροι (μήκος κύματος και ένταση φωτός, χρόνος δράσης και συγκέντρωση χρωστικών) είναι σταθερές. Ως εκ τούτου επιχρίσματα νεοπλασματικών κυττάρων από φρέσκο ιστό ή πυρήνων αφαιρεθέντων από κύβο παραφίνης, που περιέχουν ολικό πυρηνικό DNA, αποτελούν ιδανικό υλικό για το σύστημα ανάλυσης εικόνας. Παρόλα αυτά η χρησιμοποίηση ιστικών τομών πάχους 8 μm περίπου, παρά τα διάφορα επίπεδα εκτο-

μής των πυρήνων, μπορεί να μας δώσει αρκετά αξιόπιστες πληροφορίες, εφόσον η διαταραχή της μάζας του κυτταρικού DNA είναι σημαντική⁴⁻⁶.

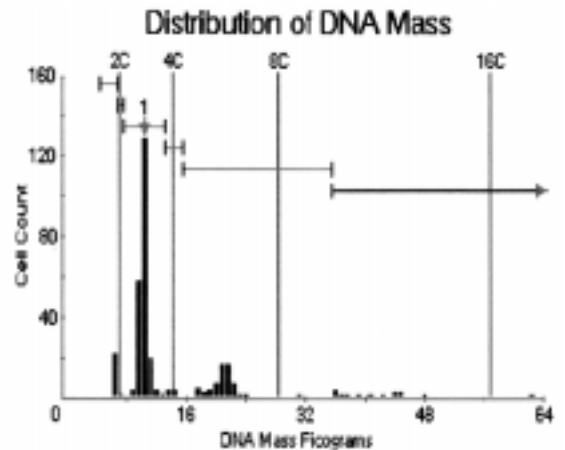
Δείκτης DNA (DNA index-DI)

Σε φάση ηρεμίας (φάση G₀) τα σωματικά κύτταρα περιέχουν σταθερή ποσότητα πυρηνικού DNA ίση με 7 pg περίπου και ονομάζονται ονομάζονται διπλοειδή. Ο δείκτης DNA προσδιορίζεται από το λόγο της μέσης μάζας DNA ενός κυττάρου σε σχέση με τη μάζα του ηρεμούντος κυττάρου⁷. Εφ' όσον το κύτταρο

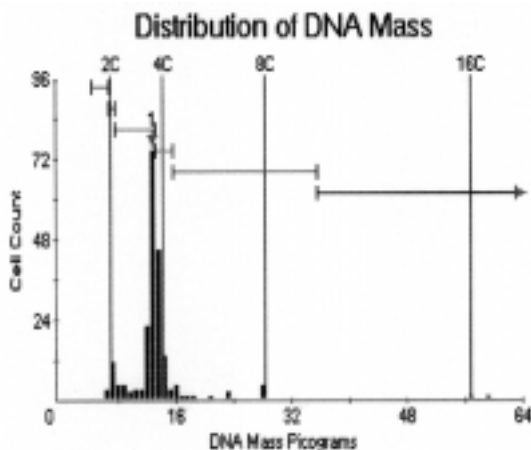
έχει την ίδια περίπου ποσότητα DNA με αυτήν του ηρεμούντος κυττάρου, τότε ο δείκτης DNA είναι 1 και το κύτταρο είναι διπλοειδές. Λόγω μιας σταθεράς αποκλίσεως επί των μετρήσεων (10%) για τεχνικούς λόγους, κάθε τιμή του δείκτη DNA διάφορη από 0,90–1,10 θεωρείται διαταραχή και εκφράζεται ως ανευπλοειδία του DNA. Η ανευπλοειδία υποδιαιρείται περαιτέρω σε υποδιπλοειδία (DI < 0,90), τριπλοειδία (DI: 1,4–1,6), τετραπλοειδία (DI: 1,8–2,20) και υπερτετραπλοειδία (DI > 2,20) (Εικόνα 1). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε ιστογράμμα ανάλυσης DNA ενός νεοπλασματος καταγράφεται ο



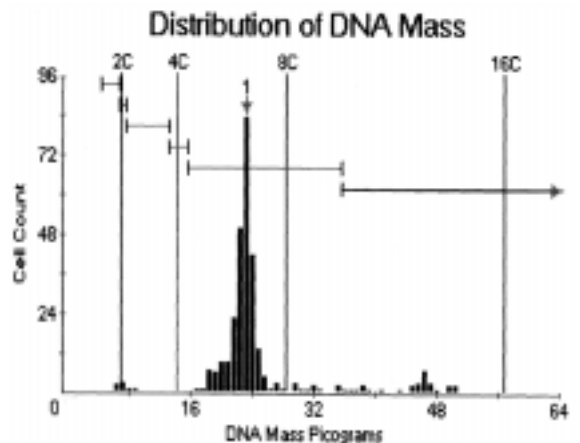
Διπλοειδές DNA
Δείκτης DNA: 1,03



Τριπλοειδές DNA
Δείκτης DNA: 1,49



Τετραπλοειδές DNA
Δείκτης DNA: 1,85



Υπερτετραπλοειδές DNA
Δείκτης DNA: 3,28

Εικόνα 1. Βασικοί τύποι ιστογραμμάτων πλοειδίας DNA.

δείκτης DNA του κυρίαρχου κυτταρικού κλώνου, ο δείκτης του κυτταρικού κλώνου με διπλάσια ποσότητα DNA καθώς και ένα φάσμα τιμών DNA μεταξύ των δύο αυτών κυτταρικών κλώνων που αποτελούν την S-φάση (Εικόνα 2). Έτσι επιτυγχάνεται γραφική απεικόνιση της βιολογίας των κυττάρων, τα οποία από τη φάση G₀ έως τη φάση G₂ λίγο πριν από τη μίτωση, διπλασιάζουν το πυρηνικό τους DNA, ενώ τα κύτταρα που ευρίσκονται μεταξύ των δύο αυτών φάσεων εμφανίζουν τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή ένα ενδιάμεσο φάσμα τιμών που αποτελούν την S-φάση. Είναι προφανές ότι και τα φυσιολογικά κύτταρα στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου, εμφανίζουν παροδική ανευπλοειδία DNA.

ΠΛΟΕΙΔΙΑ DNA ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ

Στη διεδνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες νεοπλασμάτων διαφόρων τύπων και οργάνων που έχουν γίνει με τη βοήθεια κυτταροφωτομετρικών συστημάτων. Στις μελέτες αυτές, όπως συστηματικά περιγράφονται ακολούθως, διερευνάται η σχέση των διαταραχών του πυρηνικού DNA με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους που σχετίζονται με την βιολογική συμπεριφορά των νεοπλασμά-

των και την πρόγνωση των ασθενών.

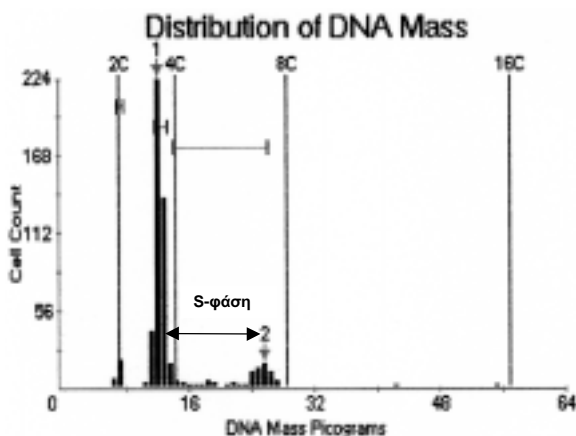
Καρκίνωμα πνεύμονα

Σημαντικός παράγοντας καλής πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνωμα πνεύμονα τόσο σε μονοπαραγοντική όσο και πολυπαραγοντική ανάλυση φαίνεται να αποτελεί η διπλοειδία του DNA σε μελέτη 100 χειρουργικά εξαιρεθέντων μη-μικροκυτταρικών καρκινωμάτων πνεύμονος⁸. Σε άλλες μελέτες καρκινωμάτων πνεύμονος παρατηρήθηκε ότι οι ανευπλοειδείς όγκοι παρουσίαζαν σημαντικά συχνότερη λεμφαγγειακή διήθηση και μετάσταση στους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου σε σχέση με τους διπλοειδείς όγκους^{9,10}. Επιπροσθέτως οι ανευπλοειδείς όγκοι εσχετίζοντο με υπερδιπλάσια πιθανότητα υποτροπής της νόσου (54% έναντι 19%) καθώς και μικρότερο ποσοστό ασθενών με διετή επιβίωση (44% έναντι 87%)⁹. Σε δύο μελέτες ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων πνεύμονα με κυτταρομετρία ροής σε υλικό παραφίνης, παρατηρήθηκε στα ανευπλοειδή νεοπλάσματα σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπής της νόσου¹¹, καθώς και μικρότερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με τα διπλοειδή (26% έναντι 70%)¹².

Καρκίνωμα μαστού

Η προγνωστική σημασία της ποσοτικής ανάλυσης του DNA στο καρκίνωμα του μαστού έχει διερευνηθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών. Η διπλοειδία του DNA φαίνεται να αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα τόσο της συνολικής όσο και της ελεύθερης νόσου επιβίωσης^{6,7}, ιδιαίτερα σε όγκους μεγέδους < 2 cm και > 5 cm ή σε καρκινώματα μαστού με δετικούς λεμφαδένες¹³. Σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες, πρόσφατη μελέτη πλοειδίας DNA σε πυρήνες φρέσκου ιστού με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι η ανευπλοειδία του DNA ήταν ανεξάρτητος παράγοντας δυσμενούς πρόγνωσης όσον αφορά την ελεύθερη νόσου αλλά και συνολική επιβίωση¹⁴. Στη μελέτη αυτή όσο και σε άλλες παρατηρήθηκε σημαντική σχέση μεταξύ των διπλοειδών όγκων και δετικών οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων καθώς και χαμηλού δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67¹⁵.

Η ανευπλοειδία του DNA, και ιδιαίτερα η περιτριπλοειδής και υπερτετραπλοειδής ανευπλοειδία, συνδέεται με παράγοντες δυσμενούς πρόγνωσης, όπως το προχωρημένο στάδιο, ο



Εικόνα 2. Παράδειγμα ιστογράμματος καρκινώματος, όπου σημειώνεται με 1 ο δείκτης DNA του κυρίαρχου κυτταρικού κλώνου που έχει τιμή 1,73 και με 2 ο δείκτης DNA των κυττάρων με διπλάσια περίπου μάζα DNA: 3,54. Μεταξύ των δύο αυτών κορυφών κατανέμονται τα κύτταρα που αποτελούν την S-φάση του κυρίαρχου κυτταρικού κλώνου (10,55%).

υψηλός βαθμός κακοηθείας, και η απουσία ορμονικών υποδοχέων^{16,17}. Επιπροσθέτως, η διπλοειδία, το μέγεθος όγκου <2 εκ και το κυτταρικό κλάσμα σε S-φάση <7% εσχετιζοντο με απουσία μεταστάσεων σε μασχαλιαίους λεμφαδένες¹⁸.

Οι κλινικές μελέτες που αφορούν την ανάλυση του DNA με κυτταρομετρία ροής αφορούν μεγάλους ψηλαφητούς όγκους, ενώ είναι περιορισμένες σε μικρά, μη ψηλαφητά καρκινώματα, λόγω έλλειψης φρέσκου ιστού. Εν τούτοις σε συγκριτική μελέτη που έγινε σε υλικό βιοψίας λεπτής βελόνης (FNA), το οποίο ελήφθη με την καθοδήγηση του μαστογράφου επί χειρουργηθέντος τμήματος μαστού και υλικού δείγματος εκτομής, βρέθηκε συμφωνία 89% όσον αφορά τον προσδιορισμό της πλοειδίας DNA. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι είναι δυνατή η ανεύρεση πολύ πρώιμων διηθητικών νεοπλασμάτων, τα οποία κλινικά δεν είναι ψηλαφητά με τη βοήθεια πλοειδίας DNA σε υλικού FNA υπό την καθοδήγηση μαστογράφου¹⁹. Σε υλικό FNA 189 καλοήθων παθήσεων μαστού, σε προδρομική μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα, βρέθηκε ότι η ανίχνευση ανευπλοειδίας σχετιζόταν με σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος μαστού, για χρονικό διάστημα παρακολούθησης 6-84 μηνών²⁰.

Καρκινώματα του γυναικείου γεννητικού συστήματος

Στα καρκινώματα των ωοθηκών η ανευπλοειδία DNA φαίνεται να σχετίζεται με βραχύτερη επιβίωση, σε μονο- ή ακόμη και σε πολυπαράγοντική ανάλυση, ιδιαίτερα σε καρκινώματα προχωρημένου σταδίου, όχι όμως και με ελεύθερη νόσου επιβίωση⁶. Η ανευπλοειδία σχετίζεται επίσης με το στάδιο και την διαφοροποίηση των όγκων. Ειδικότερα, ανευπλοειδία DNA παρατηρείται πιο συχνά σε καρκινώματα σταδίου III και IV (48% - 81%) και σε αυτά με βαθμό κακοηθείας 2 και 3 (88%)^{6,7}. Επιπροσθέτως, η πλοειδία DNA έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την πρόγνωση των οριακής κακοηθείας όγκων ωοθήκης²¹.

Σε άλλη προδρομική μελέτη που αφορούσε καρκινώματα ωοθήκης η πλοειδία του DNA προσδιορίσθηκε συγκριτικά με κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα φρέσκου ιστού και παραφίνης. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι το ποσοστό των ανευπλοειδών περιπτώσεων σε φρέσκο υλικό ήταν κατά 15% μεγα-

λύτερο από το αντίστοιχο σε υλικό παραφίνης και ότι η προγνωστική σημασία της ανάλυσης του φρέσκου ιστού ήταν ανώτερη από αυτήν του υλικού της παραφίνης. Η ερμηνεία επομένως των αποτελεσμάτων από υλικό παραφίνης θα πρέπει να είναι περισσότερο επιφυλακτική σε σχέση με το φρέσκο ιστό και να χρησιμοποιείται μόνο όταν είναι αδύνατη η λήψη φρέσκου υλικού²².

Όσον αφορά τα καρκινώματα του ενδομητρίου, σε μια μελέτη βρέθηκε ότι παρουσιάζουν σε μεγάλο ποσοστό (68,8%) ανευπλοειδία DNA, σε αντίθεση με την υπερπλασία του ενδομητρίου που εμφανίζει μικρό ποσοστό (2,5%) ανευπλοειδίας και το φυσιολογικό ενδομήτριο που είναι αποκλειστικά διπλοειδές²³. Σε άλλη μελέτη 80 αδενοκαρκινωμάτων ενδομητρίου με κυτταρομετρία ροής βρέθηκε ότι η ανευπλοειδία DNA και το υψηλό ποσοστό κυττάρων σε S-φάση ήταν σημαντικοί παράγοντες φτωχής πρόγνωσης, αλλά η υψηλή S-φάση είχε μεγαλύτερη προγνωστική αξία και επιπλέον μπορούσε να χρησιμεύσει για την επιλογή της ομάδας ασθενών που θα επωφελείτο από επιπρόσθετες θεραπευτικές παρεμβάσεις²⁴. Η κυτταρομετρική ανάλυση DNA σε αδενοκαρκινώματα ενδομητρίου μπορεί να γίνει με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας και προεγχειρητικά και να συμβάλλει στην επιλογή των ασθενών με μικρό κίνδυνο λεμφαδενικών μεταστάσεων που μπορούν να αντιμετωπισθούν με διαφορετική χειρουργική προσπέλαση²⁵. Επιπλέον, τα αδενοκαρκινώματα του ενδομητρίου με διπλοειδές DNA εμφανίζουν πιο συχνά δετικότητα στους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς, καλλίτερη ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία και μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης⁶.

Τέλος, σε μελέτη που έγινε σε ασθενείς με καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας σταδίου Ib ή IIa ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι ο δείκτης DNA συσχετιζόταν με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Όγκοι με δείκτη DNA (DI) > 1.3 είχαν καλλίτερη ανταπόκριση στη θεραπεία από αυτούς με DI = 1.3²⁶.

Καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως

Σε αναδρομική μελέτη 81 ασθενών με μεταβατικού τύπου καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως από τους οποίους είχαν ληφθεί πολλαπλές βιοψίες, αναλύθηκε η πλοειδία DNA με κυτταρομετρία ροής σε υλικό παραφίνης. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η

ανευπλοειδία σχετιζόταν με χειρότερη πρόγνωση. Επιπροσθέτως σε διαδοχικές υποτροπές των όγκων παρατηρήθηκε σημαντική χειροτέρευση του βαθμού ανευπλοειδίας των όγκων²⁷.

Σημαντική σχέση μεταξύ του δείκτη DNA και ιστολογικού βαθμού κακοηθείας παρατηρήθηκε σε άλλη κυτταρομετρική μελέτη καρκινωμάτων ουροδόχου κύστεως. Ειδικότερα, καρκινώματα με περιδιπλοειδές DNA εμφανίζουν στο μεγαλύτερο ποσοστό στάδιο T1 και βαθμό κακοηθείας (grade) 2²⁸.

Τα καρκινώματα από μεταβατικό επιθήλιο εμφανίζουν έντονη τάση για τοπικές υποτροπές. Ακόμη και τα επιφανειακά καρκινώματα με ανευπλοειδές DNA εμφανίζουν τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τα καρκινώματα με διπλοειδές DNA^{29,30}.

Καρκίνωμα προστάτου

Η κλινική σημασία του καθορισμού της πλοειδίας DNA στο καρκίνωμα του προστάτου θεωρείται πολύτιμη, παρά το γεγονός ότι συχνά παρατηρείται ετερογένεια όσον αφορά την κατανομή της εντός του όγκου³¹. Με μονοπαραγοντική ανάλυση η διπλοειδία DNA, σχετίζεται έντονα με καλλίτερη πρόγνωση και μάλιστα ανεξάρτητα από το στάδιο ή τη θεραπεία^{32,33}. Επιπροσθέτως σε μερικές μελέτες η πλοειδία DNA φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της νόσου ακόμη και με πολυπαραγοντική ανάλυση⁶.

Όγκοι με μικρό βαθμό Gleason εμφανίζουν συνήθως διπλοειδές DNA ενώ αυτοί με υψηλό βαθμό Gleason εμφανίζουν πιο συχνά ανευπλοειδία. Σε όγκους ενδιάμεσου βαθμού Gleason, που είναι και οι περισσότεροι, η πλοειδία του DNA συμβάλλει στην αναγνώριση υποομάδας ασθενών με ανευπλοειδές DNA, η οποία μπορεί να επωφεληθεί από μία επιδεκτικότερη θεραπευτική προσέγγιση. Αναφέρεται, επίσης, ότι ασθενείς με ανευπλοειδία DNA που βρίσκονται σε στάδιο C και D εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση και δεν ανταποκρίνονται συνήθως στη θεραπεία με αντι-ανδρογόνα^{7,32}.

Καρκινώματα γαστρεντερικού σωλήνα

Στα καρκινώματα του στομάχου σε μελέτη 136 περιπτώσεων με κυτταρομετρία ροής σε υλικό παραφίνης μετά από θεραπευτική γαστρεκτομή βρέθηκε ότι η πλοειδία DNA σχετιζόταν σημαντικά με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, αυξημένη έκφραση EGF-R και

μεγάλο βάθος διήθησης. Επιπροσθέτως σύμφωνα με την ίδια μελέτη, η ανευπλοειδία DNA αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα βραχύτερης επιβίωσης των ασθενών³⁴. Τα γαστρικά καρκινώματα με ανευπλοειδία DNA φαίνεται ότι σχετίζονται, στις περισσότερες μελέτες, με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διήθησης και μετάστασης και επομένως και χειρότερης πρόγνωσης σε σχέση με αυτά που χαρακτηρίζονται από διπλοειδία DNA³⁵.

Στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου η προγνωστική σημασία της πλοειδίας DNA δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η ανευπλοειδία DNA είναι ασθενούς προγνωστικός παράγοντας ο οποίος σχετίζεται με τον υψηλό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κακή πρόγνωση^{36,37}. Οι περισσότερες κυτταροφωτομετρικές μελέτες δείχνουν μία αυξανόμενη σε συχνότητα ανευπλοειδία DNA παράλληλα με τη σταδιοποίηση κατά DUKES^{36,38,39}. Ειδικότερα, η συχνότητα της ανευπλοειδίας στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου κυμαίνεται από 33% στο στάδιο A μέχρι 88% στο στάδιο D^{40,41}. Η προγνωστική αξία της πλοειδίας DNA είναι ισχυρότερη στα στάδια B και C κατά Dukes, ενώ σε καρκινώματα σταδίου A δεν μπορεί να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη, εφ' όσον οι ασθενείς εμφανίζουν άριστη πρόγνωση (5-ετής επιβίωση >90%). Ιδιαίτερα σε όγκους σταδίου B η παρουσία διπλοειδίας έχει σημαντική προγνωστική αξία, δεδομένου ότι οι όγκοι με διπλοειδές DNA έχουν καλλίτερη ανταπόκριση σε επικουρική χημειοθεραπευτική αγωγή³⁷. Θα πρέπει όμως να τονισθεί ότι η ομάδα μελέτης και ανασκόπησης της κλινικής σημασίας της πλοειδίας του DNA στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου συνιστά τη χρήση φρέσκου ιστού και επιχρισμάτων ολόκληρων κυττάρων προς αποφυγή τεχνικών προβλημάτων από τη χρήση υλικού σε παραφίνη³⁷.

Σε πλέον πρόσφατες μελέτες αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου που έγιναν με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση της ανευπλοειδίας DNA με την εξάλειψη της περιοχής του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 17 που αντιστοιχεί στο p53⁴². Όσον αφορά την κακοήδη εξαλλαγή σε περιπτώσεις χρόνιας ελκώδους κολίτιδος έχει παρατηρηθεί ισχυρή σχέση μεταξύ ανευπλοειδίας του DNA και της ιστολογικής μετατροπής από χαμηλόβαθμη δυσπλασία σε καρκίνωμα⁴³.

Λεμφοϋπερπλαστικές νόσοι

Η ανάλυση του κυτταρικού DNA έχει μάλλον περιορισμένη αξία στην αντιμετώπιση και παρακολούθηση των λεμφοϋπερπλαστικών νόσων. Όσον αφορά τη νόσο Hodgkin, η πλοειδία DNA δεν φαίνεται να παρέχει προγνωστικής φύσεως πληροφορίες⁴⁴. Στα μη-Hodgkin λεμφώματα η ανευπλοειδία DNA είναι πιο συχνή στα υψηλής κακοηθείας χωρίς όμως να αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα^{44,45}. Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αντίθετα, σε πολλές μελέτες δείχνει να έχει σταθερή και σημαντική σχέση με φτωχή πρόγνωση ασθενών με μη-Hodgkin λέμφωμα⁷.

Στο πολλαπλούν μυέλωμα η υπερδιπλοειδής ανευπλοειδία DNA φαίνεται να σχετίζεται με καλλίτερη πρόγνωση των ασθενών σε σχέση με τη διπλοειδία ή υποδιπλοειδία του DNA, αλλά μάλλον απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την επιβεβαίωση των συμπερασμάτων αυτών^{46,47}.

Σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία η υπερδιπλοειδής ανευπλοειδία αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα για την πρόγνωση. Ειδικότερα σε μεγάλη μελέτη 1535 παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία βρέθηκε ότι η υπερδιπλοειδία (δείκτης DNA υψηλότερος από 1,16) αποτελούσε τον ισχυρότερο παράγοντα ευνοϊκής πρόγνωσης. Οι ασθενείς αντίθετα με υποδιπλοειδία DNA είχαν άσχημη πρόγνωση⁴⁸. Στη οξεία μυελογενή λευχαιμία δεν έχει παρατηρηθεί σαφής σχέση μεταξύ της πλοειδίας DNA και της πρόγνωσης⁴⁴.

Όγκοι ενδοκρινών αδένων

Η πλοειδία DNA δεν συμβάλλει στη διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων ενδοκρινών αδένων δεδομένου ότι έχει περιγραφεί ανευπλοειδία σε αδενώματα του θυρεοειδούς, των παραθυρεοειδών αδένων, των επινεφριδίων και του ενδοκρινούς παγκρέατος⁷. Σε κυτταρομετρική μελέτη φαιοχρωμοκυτωμάτων σε υλικό παραφίνης παρατηρήθηκε ότι η ανευπλοειδία σχετιζόταν σημαντικά με τη διήθηση των αγγείων, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και την προοδευτική επιδείνωση της νόσου⁴⁹. Σε μελέτη 26 αδενωμάτων υποφύσεως οι Kontogeorgos και συν.⁵⁰ βρήκαν ότι η ανευπλοειδία σχετιζόταν με τα μακροαδενώματα, το προχωρημένο στάδιο, τη διήθηση της σκληρής μήνιγγας και τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ανευπλοειδία DNA στις μέχρι τώρα μελέτες αδενωμά-

των υποφύσεως φαίνεται να είναι συχνότερη στα λειτουργικά αδενώματα και ιδίως σε αυτά που παράγουν προλακτίνη ή αυξητική ορμόνη^{51,52}.

Στα δηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς η ανάλυση του DNA μπορεί να βοηθήσει στην καλλίτερη διάκριση μεταξύ τοπικών, μη διηθητικών νεοπλασμάτων που είναι κατά κανόνα διπλοειδή και τοπικά διηθητικών, τα οποία παρουσίαζαν κατά 40% ανευπλοειδία⁵³. Σε άλλη μελέτη περιπτώσεων δηλώδους καρκινώματος και μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών διαπιστώθηκε ότι η ανευπλοειδία σχετιζόταν με σημαντικά βραχύτερη επιβίωση⁵⁴.

Μελάνωμα δέρματος

Η διάκριση ανάμεσα σε καλοήθεις και κακοήθεις μελανοκυτταρικούς όγκους δέρματος είναι σε ορισμένες περιπτώσεις δύσκολη. Σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη καλοήθων μελανοκυτταρικών αλλοιώσεων και μελανώματος με ανάλυση εικόνας βρέθηκε ότι η παρουσία ανευπλοειδίας είναι σημαντικά πιο συχνή στο πρωτοπαθές και μεταστατικό κακόηδες μελάνωμα (86% και 73%) απ'ότι σε καλοήθεις μελανοκυτταρικές αλλοιώσεις του δέρματος (16%). Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η συχνότητα της ανευπλοειδίας DNA αυξανόταν ανάλογα με το βάθος διήθησης κατά Breslow⁵⁵. Σε μελανώματα σταδίου I σε πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι η ανευπλοειδία σχετιζόταν σημαντικά με βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση και χειρότερη πρόγνωση, αλλά η προγνωστική της σημασία χάθηκε όταν έγινε ομαδοποίηση των ασθενών ανάλογα με το βάθος διήθησης⁵⁶. Σε μελανώματα σταδίου III η ανευπλοειδία DNA σχετίζεται με σημαντικά βραχύτερη συνολική επιβίωση των ασθενών^{57,58}.

Σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη μεταξύ πλοειδίας DNA και των γονιδίων επιδιόρθωσης DNA MLH1 και MSH2 σε επίπεδο mRNA παρατηρήθηκε σημαντική σχέση μεταξύ ανευπλοειδίας και απουσίας έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης στα μεταστατικά μελανώματα⁵⁹.

Νεοπλάσματα όπου η ανευπλοειδία αποτελεί παράγοντα καλής πρόγνωσης

Στα περισσότερα από τα νεοπλάσματα που περιγράψαμε η ανευπλοειδία σχετίζεται κατά κανόνα με δυσμενή πρόγνωση. Υπάρχουν όμως νεοπλάσματα, στα οποία η ανευπλοειδία αποτελεί παράγοντα καλής πρόγνωσης. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται η οξεία λεμφο-

βλαστική λευχαιμία, το ραβδομυοσάρκωμα, το νευροβλάστωμα, το μυελοβλάστωμα, το ρετινοβλάστωμα και το επενδύωμα⁷. Κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των νεοπλασμάτων της παιδικής ηλικίας είναι η ευνοϊκή ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Τα κακοήδη νεοπλάσματα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στη βιολογική τους συμπεριφορά, η οποία σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τις γενετικές αλλοιώσεις που έχουν συσσωρευτεί στο πυρηνικό DNA. Πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά την πρόγνωση προσφέρουν οι κλασσικοί δείκτες όπως το στάδιο, ο ιστολογικός τύπος, και ο βαθμός κακοηθείας. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως απαιτούνται περισσότερες και ακριβέστερες πληροφορίες για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ασθενών αυτών. Στις περιπτώσεις αυτές ο προσδιορισμός της πλοειδίας του DNA, που σήμερα είναι δυνατός με σημαντικό βαθμό αξιοπιστίας ακόμη και σε επιχρίσματα πυρήνων από κύβο παραφίνης, μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στην ακριβέστερη εκτίμηση του δυναμικού κακοηθείας των νεοπλασματικών όγκων και στον καλλίτερο σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boveri T. Zur frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fisher, 1914.
2. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. Willey & Sons Pb. New York 1995.
3. Kapranos N, Kontogeorgos G, Frangia K, Kokka E: Effect of fixation on interphase cytogenetic analysis by direct fluorescence in situ hybridization on cell imprints. *Biotech Histochem* 72:148-151, 1997.
4. Mellin W: Cytophotometry in tumor pathology. *Path Res Pract* 186:37-62, 1990.
5. Καπράνος Ν. Κυτταροφωτομετρία: Ένα νέο ισχυρό εργαλείο ανάλυσης νεοπλασμάτων. *Ιατρ. Επιθ. Ινστ. "Ο ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ"*, 2(3):58-59, 1990.
6. Cohen C. Image Cytometric Analysis in Pathology. *Human Pathology* 27:482-491, 1996.
7. Marchevsky AM and Bartels PH. Image Analysis: A primer for pathologists. Raven Press, New York 1994.
8. Zimmerman PV, Hawson GA, Bint MH, Parsons PG. Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet* 5;2(8558):530-3, 1987.
9. Ogawa J, Tsurumi T, Inoue H, Shohtsu A. Relationship between tumor DNA ploidy and regional lymph node changes in lung cancer. *Cancer* 69:1688-95, 1992.
10. Ayabe H, Tomita M, Kawahara K, Tagawa Y, Tsuji H, Akamine S. DNA stemline heterogeneity of non-small cell lung carcinomas and differences in DNA ploidy between carcinomas and metastatic nodes. *Lung Cancer* 11:201-8, 1994.
11. Dyszkiewicz W, Kasprzyk M, Piwkowski C, Gasiorowski L. Prognostic significance of DNA ploidy in squamous cell lung carcinoma: is it really worth it? *Ann Thorac Surg* 70:1629-33, 2000.
12. Sahin AA, Ro JY, el-Naggar AK, Lee JS, Ayala AG, Teague K, Hong WK. Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. Ploidy as a significant prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 65:530-7, 1990.
13. Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, Willig AJ, Los J, Peterse JL, Ruitenberg HM, Schapers RF, Somsen JG, van Beek MW, Bellot SM, Fijnheer J, van Gorp LH. Prognostic value of DNA ploidy using flow cytometry in 1301 breast cancer patients: results of the prospective Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Mod. Pathol.* 10:762-8, 1997.
14. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of DNA ploidy in 653 Japanese women with node-negative breast cancer. *Int J Clin Oncol* 6:177-82, 2001.
15. Leers MP, Schutte B, Theunissen PH, Ramaekers FC, Nap M. A novel flow cytometric steroid hormone receptor assay for paraffin-embedded breast carcinomas: an objective quantification of the steroid hormone receptors and direct correlation to ploidy status and proliferative capacity in a single-tube assay. *Hum Pathol* 31:584-92, 2000.
16. Pinto AE, Andre S, Nogueira M, Mendonca E, Soares J. Flow cytometric DNA hypertetraploidy is associated with unfavourable prognostic features in breast cancer. *J Clin Pathol* 50:591-5, 1997.
17. Leonardi E, Cristofori A, Caffo O, Dalla Palma P. Cytometric DNA analysis and prognostic biomarkers in breast carcinoma. Expression of P53 product in the different ploidy classes. *Anal Cell Pathol* 15(1):31-45, 1997.
18. Zanon C, Durando A, Geuna M, Clara R, Mobiglia A, Massobrio M, Palestro G, Pourshayesteh A. Flow cytometry in breast cancer:

- prognostic and surgical indications of the sparing of axillary lymph node dissection. *Am J Clin Oncol* 21:392-7, 1998.
19. Stomper PC, DeBloom JR, Levine E, Budnick RM, Stewart CC. Flow cytometric DNA analysis of invasive carcinomas detected by screening mammography: use of specimen mammography-guided fine-needle aspirates. *Clin Cancer Res* 4:1789-95, 1998.
 20. Stomper PC, DeBloom JR 2nd, Budnick RM, Stewart CC. Flow cytometric DNA analyses of benign breast lesions detected by screening mammography. *Clin Cancer Res* 4:1543-7, 1998.
 21. Darai E, Walker-Combrouze F, Dauge-Geoffroy MC, Vincent Y, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY. Ki-67 expression in 35 borderline ovarian tumours: relations with clinicopathologic parameters and ploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 76:175-80, 1998.
 22. Eissa S, Khalifa A, Laban M, Elian A, Bolton WE. Comparison of flow cytometric DNA content analysis in fresh and paraffin-embedded ovarian neoplasms: a prospective study. *Br J Cancer* 77:421-5, 1998.
 23. Eissa S, Abu Saada M, el-Sharkawy. Flow cytometric cell cycle kinetics and quantitative measurement of c-erbB-2 and mutant p53 proteins in normal, hyperplastic and malignant endometrial biopsies. *Clin Biochem* 30:209-14, 1997.
 24. Kaleli S, Kosebay D, Bese T, Demirkiran F, Oz UA, Arvas M, Aydinli K, Erkun E.D. A strong prognostic variable in endometrial carcinoma: flow cytometric S-phase fraction. *Cancer* 79:944-51, 1997.
 25. Valsecchi L, Mangili G, Frigerio L, Spagnolo DL, De Sanctis L, Ferrari A. Reliability of preoperative evaluation of prognostic factors in endometrial carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet* 59:35-9, 1997.
 26. Lai CH, Hsueh S, Chang TC, Tseng CJ, Huang KG, Chou HH, Chen SM, Chang MF, Shum HC. Prognostic factors in patients with bulky stage 1B or IIA cervical carcinoma undergoing neoadjuvant chemotherapy and radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 64:456-62, 1997.
 27. Wu L, Lochhead A, Yang J, Ow KT, Russell PJ. DNA-Flow cytometric analysis of bladder TCC using paraffin-embedded tissues. *Urol Int* 60:208-15, 1998.
 28. Armone S, Voce S, dal Pozzo C, Severini G, Montanari F, Monti G, Tavalazzi L. Cytofluorimetric evaluation of DNA ploidy in the diagnosis of bladder cancer. *Arch Esp Urol* 51:507-10, 1998.
 29. Tizzani A, Casetta G, Gontero P, Giammo A, Ghabin H, Demurtas S, Pacchioni D. DNA flow cytometry and Ki-67 proliferating index as prognostic factors of early recurrence and progression in G1-G2/Ta-T1 and G3/Ta-T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Minerva Urol Nefrol* 49:141-3, 1997.
 30. Nanning H, Rassler J, Minh DH, Stolzenburg JU. The value of DNA cytometry in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Gen Diagn Pathol* 143:231-6, 1997.
 31. Wang N, Wilkin C, Bocking A, Tribukait B. Evaluation of tumor heterogeneity of prostate carcinoma by flow- and image DNA cytometry and histopathological grading. *Anal Cell Pathol* 20:49-62, 2000.
 32. Shankey TV, Kallioniemi OP, Koslowski JM et al. Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer. *Cytometry*. 14:497-500, 1993.
 33. Ahlgren G, Lindholm K, Falkmer U, Abrahamsson PA. A DNA cytometric proliferation index improves the value of the DNA ploidy pattern as a prognosticating tool in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 50(3): 379-84, 1997.
 34. Santoro E, Carboni M, Catarci M, Carlini M, Carboni F, Zupi G, Vecchione A, D'Agnano I, Giannarelli D, Santoro R, Garofalo A. DNA ploidy, proliferative index and EGF-R status in 130 cases of resected gastric cancer-a multivariate analysis. *Hepatogastroenterology* 44: 826-37, 1997.
 35. Baba H, Korenaga D, Kakeji Y, Haraguchi M, Okamura T, Maehara Y. DNA ploidy and its clinical implications in gastric cancer. *Surgery* 131(1 Suppl):S63-70, 2002.
 36. Bosari S, Lee AK, Wiley BD, Heatley GJ, Hamilton WM, Silverman ML. DNA quantitation by image analysis of paraffin-embedded colorectal adenocarcinomas and its prognostic value. *Mod Pathol* 5:324-8, 1992.
 37. Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, Melamed M, Zarbo RJ, Witzig TE, Rabinovitch PS. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry*; 14:486-91, 1993.
 38. Crissman JD, Zarbo RJ, Niebylski CD, Corbett T, Weaver D. Flow cytometric DNA analysis of colon adenocarcinomas: a comparative study of preparatory techniques. *Mod Pathol* 1:198-204, 1988.
 39. Albe X, Vassilakos P, Helfer-Guarnori K, Givel JC, de Quay N, Suardet L, Eliason JF, Odartchenko N. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 66:1168-75, 1990.
 40. Silvestrini R, D'Agnano I, Faranda A, Costa A, Zupi G, Cosimelli M, Quagliuolo V, Giannarelli D, Gennari L, Cavaliere R. Flow cytometric analysis of ploidy in colorectal cancer:

- a multicentric experience. *Br J Cancer* 67:1042-6, 1993.
41. Fenoglio-Preiser CM et al. *Gastrointestinal Pathology – an atlas and text*, σ. 1023-1024, 2nd edition, Lippincott-Raven, 1999.
 42. Cianchi F, Balzi M, Becciolini A, Giache V, Messerini L, Palomba A, Tisti E, Faraoni P, Chellini F, Pucciani F, Perigli G, Cortesini C. Correlation between DNA content and p53 deletion in colorectal cancer. *Eur J Surg* 165: 363-8, 1999.
 43. Holzmann K, Klump B, Borchard F, Hsieh CJ, Kuhn A, Gaco V, Gregor M, Porschen R. Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int J Cancer* 76:1-6, 1998.
 44. Duque RE, Andreeff M, Braylan RC, Diamond LW, Peiper SC. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in neoplastic hematopathology. *Cytometry* 14:492-6, 1993.
 45. Horii A, Yoshida J, Hattori K, Honjo Y, Mitani K, Takashima S, Sakai M, Okamoto S, Kubo T. DNA ploidy, proliferative activities and immunophenotype of malignant lymphoma: application of flow cytometry. *Head Neck* 20: 392-8, 1998.
 46. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A. DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 23:33-41, 1996.
 47. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98: 2229-38, 2001.
 48. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10:606-13, 1992.
 49. Nativ O, Grant CS, Sheps SG, O'Fallon JR, Farrow GM, van Heerden JA, Lieber MM. The clinical significance of nuclear DNA ploidy pattern in 184 patients with pheochromocytoma. *Cancer* 69:2683-7, 1992.
 50. G. Kontogeorgos, N. Kapranos, D. Rologis, E. Vamvasakis, N. Papadopoulos. DNA measurement in pituitary adenomas assessed on imprints by image analysis. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 18:144-150, 1996.
 51. Anniko M, Trivukait B, Wersall J. DNA ploidy and cell phase in human pituitary tumors. *Cancer* 53:1808-1813, 1984.
 52. Stefaneanu L, Murray D, Kovacs K, Smyth HS. Comparative study of DNA content and interphase nuclear organizer regions in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 1:187-182, 1990.
 53. Stern Y, Lisnyansky I, Shpitzer T, Nativ O, Medalia O, Feinmesser R, Aronson M. Comparison of nuclear DNA content in locally and noninvasive papillary carcinoma of the thyroid gland. *Otolaryngol Head Neck Surgery* 117:501-3, 1997.
 54. Yamashita H, Noguchi S, Murakami N, Tsuji K, Yamaoka N, Sakamoto A. DNA ploidy and stromal bone formation as prognostic indicators of thyroid papillary carcinoma in aged patients: a retrospective study. *Acta Pathol Jpn* 1993 Jan-Feb; 43(1-2):22-7.
 55. Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, Tanner B, Heine M. Evaluation of DNA ploidy and degree of DNA abnormality in benign and malignant melanocytic lesions of the skin using video imaging. *Cancer* 88:1370-7, 2000.
 56. Gattuso P, Reddy V, Solans E, Kathuria S, Aranha GV, Jacobs HK, Walloch J. Is DNA ploidy of prognostic significance in stage I cutaneous melanoma? *Surgery* 108:702-8, 1990.
 57. Martin G, Halwani F, Shibata H, Meterissian S. Value of DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in stage III cutaneous melanoma. *Can J Surg* 43:29-34, 2000.
 58. Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J, Kagedal B, Bratel AT, Wingren S. DNA ploidy and S-phase in primary malignant melanoma as prognostic factors for stage III disease. *Br J Cancer* 67:134-8, 1993.
 59. Korabiowska M, Ruschenburg I, Schlott T, Kubitz A, Brinck U, Droese M. Relation between DNA ploidy status and the expression of the DNA-mismatch repair genes MLH1 and MSH2 in cytological specimens of melanoma lymph node and liver metastases. *Diagn Cytopathol* 24:157-62, 2001.

Corresponding author:

N. Kapranos,

11 Meg. Spileou str., 115 22 Athens,

Tel. 0108038121, Fax: 0108041372,

e-mail: nkapran@otenet.gr

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Νικηφόρος Καπράνος,

Μεγάλου Σπηλαίου 11, 11522 Αθήνα,

Τηλ. 0108038121, Fax: 0108041372,

e-mail: nkapran@otenet.gr