

PROSTATIN KARSİNOMLARI VE PREKANSERÖZ LEZYONLARINDA AgNOR YÖNTEMİ

Uzm. Dr. Y. GÜRBÜZ(*), Yard. Doç. Dr. I. KILIÇASLAN(*), Uzm. Dr. Ö. DOĞAN(*), Prof. Dr. V. UYSAL(*)

ÖZET: Çalışmamızda 33 prostat kansinomu, 35 prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN), 5 atipik adenomatöz hiperplazi (AAH) ve 10 benign prostat hiperplazisi vakasında AgNOR benekciklerinin sayı ve morfolojik özellikleri araştırılmış, bu grupların farklı olduğunu gösteren istatistiksel değerler elde edilmiştir. Ancak düşük gradlı kansinom, PIN 2-3 ve AAH arasında farklılıklar saptanamamıştır. Tümör diferansiyasyonu azaldıkça AgNOR sayısının artması, diferansiyasyon ile AgNOR sayısı arasında bağlantı olduğunu göstermiştir ($p>0.01$). İyi ve orta derecede diferansiye tümörler arasında saptanan fark AgNOR sayısının diğer parametrelerle birlikte bu iki grubun ayrıcı tanısında kullanılabileceğini göstermekteydi ($P=0.000095$). PIN 1 ve PIN 2-3'ün AgNOR sayıları arasındaki fark bu lezyonların farklı iki grup olduğu sonucunu verdi ($P=0.001$). PIN 2-3 ile düşük gradlı tümörlerde belli bir fark saptanamaması AgNOR yönteminin bu iki lezyonun ayrıcı tanısında kullanılamayacağını göstermekteydi ($P=0.3$). AgNOR benekciklerinin disosiasyonu ve asosiasyon yapan gruplardaki benekcik sayısı diferansiyasyonun azaldıkça artmaktaydı. PIN 2-3 ve iyi diferansiye kansinomlardaki AgNOR benekciklerinin morfolojik özellikleri ayrıcı tanıda kullanılamayacak şekilde benzerlik göstermekteydi.

SUMMARY: In this study, AgNOR staining technique was used for AgNOR proteins in 33 prostate carcinoma, 35 prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), 5 atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and 10 benign prostate hyperplasia. Some significant statistical differences in mean AgNOR counts between these groups were noted. But between PIN 2-3, AAH, and low grade carcinoma groups significant difference was not noted. Increasing AgNOR count with decreasing tumor differentiation showed that there was correlation between AgNOR count and tumor differentiation ($P<0.01$). Statistical difference between well and moderately differentiated tumors ($P=0.000095$) was demonstrated. AgNOR count may be a supplement to other parameters in differential diagnosis of these two groups. We didn't find statistical difference between PIN 2-3 and low grade prostatic carcinoma ($P=0.3$) and we think that AgNOR technique is not effective in differential diagnosis of these two groups. AgNOR dot disassociation and number of dots in associated groups increased by decreasing tumor differentiation. We included that AgNOR staining pattern of PIN 2-3 and well differentiated carcinoma is so similar that it can't be used in differential diagnosis of these two groups.

GİRİŞ

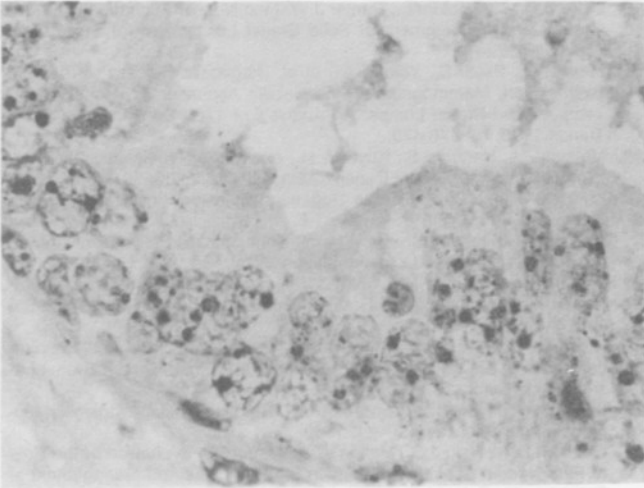
Prostat kansinomlarının histopatolojik özellikleri ve prognoz arasındaki ilişkiyi araştırarak pek çok çalışma yapılmış ve bu bağlantıyı gösterdiği öne sürülen çok sayıda sınıflandırmalar önerilmiştir. Bu sınıflandırmalardan en güncel olan ikisi Gleason (8) ve WHO (15)'dur.

Prostatin prekanseröz lezyonları prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) (2) ve kimi araştırmacılara göre prekanseröz olduğu kuşkuyla bulunan ve küçük asiner kansinomla ayrıcı

tanısında sorun yaratan atipik adenomatöz hiperplazidir (AAH) (3). PIN'in özellikle yüksek gradlı olanları tümörlü prostatlarda çok sık olarak izlenmektedir (3). Prostat kansinomu ve PIN arasında immunfenotipik ve sitolojik özellikler konusunda pek çok benzerlik vardır (8,17).

AgNOR (argirofil nukleoler organizasyon bölgesi) bir hücre kinetiği yöntemi olup hücrenin proliferatif aktivitesi ve sentez yeteneğini gösterir. Bu nedenle prostat kansinomları ve prekanseröz lezyonlarının tanı ve diferansiyasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (7,9,10,18).

Bu çalışmada prostat kansinomlarının diferansiyasyonu



Resim 1. Ağır displazi vakasında genellikle asosiasyon oluşturan sayıca az AgNOR benekcikleri (Prot No: 20447/93 AgNOR X 1250).

ve PIN'lerin gradlarına göre AgNOR sayısı arasındaki ilişki araştırıldı. Ayrıca her iki grubun AgNOR sayısı ve morfolojik yapısı karşılıklı olarak değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda 1983-1994 yılları arasında incelenmiş vakalardan 33 prostat karsinomu, 35 prostatik intraepitelyal neoplazi, 5 atipik adenomatöz hiperplazi, 10 tümör ve PIN çevresinde bulunan benign prostat hiperplazisi alanı çalışma kapsamına alındı.

Materyal 22 radikal prostatektomi, 18 açık prostatektomi, 11 transüretal rezeksiyondan oluşmaktaydı. Rutin takipten sonra elde edilen parafin bloklardan 3 mikronluk 2 kesit hazırlandı. Kesitlerden biri hematoxilen eozin, diğeri AgNOR yöntemiyle (19) boyandı.

Tümörler Gleason sınıflamasına göre değerlendirilerek 5 patern ve 2'den 10'a kadar 8 patern skor belirlendi (8). Daha sonra Gleason sınıflaması WHO'ya uyarlanarak patern skor 2,3,4,5 iyi, 6,7,8 orta, 9,10 az diferansiye kabul edildi.

PIN Mc Neal'in 1986'da yaptığı tanımlama ve sınıflama-

nın Brawer tarafından 1992'deki modifiye edilen şekline göre değerlendirildi ve PIN 1-2-3 olmak üzere ayrıldı (2). AAH'ler Brawn'ın 1992 yılında yaptığı çalışmaya göre incelendi (3). AgNOR benekciklerinin sayım işlemi sedir yağı damlatılarak 1000'lik büyütmede rastgele 100 hücre nüvesinde Crocker (5) ve Howat (11) yöntemine göre yapıldı. Crocker yöntemine göre izlenen her benekcik sayıldı, Howat yönteminde ise asosiasyon yapan gruplar tek AgNOR olarak değerlendirildi.

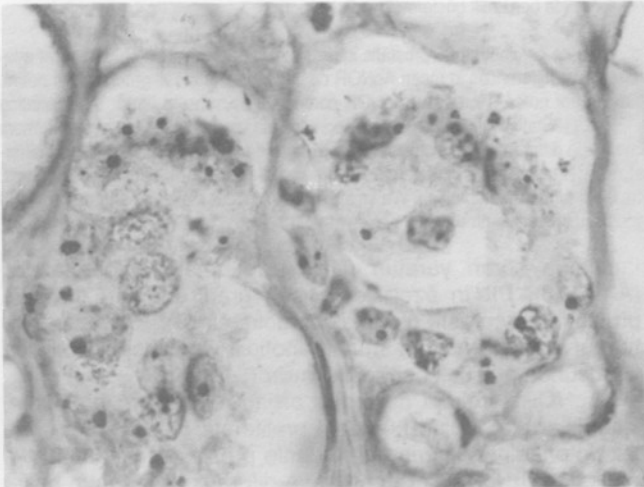
Regresyon testi ile prostat karsinomlarının patern skorları ve PIN gradları ile Crocker ve Howat'a göre AgNOR sayıları arasındaki ilişki belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca student-t testi ile de hiperplazi, PIN ve karsinom gruplarının AgNOR benekcik sayıları arasındaki farklılıklar ayrı ayrı saptandı. Aynı yöntemle PIN ve karsinom gradları, gruplar kendi aralarında bölünerek PIN 2-3 ile iyi diferansiye karsinom grupları, AAH ile iyi diferansiye karsinom grupları arasındaki farklılıklar da belirlendi.

BULGULAR

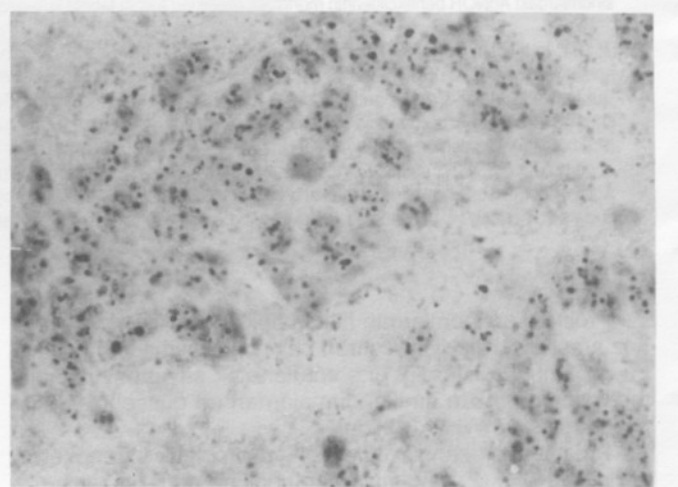
Çalışma kapsamına aldığımız tümör, PIN, AAH ve BPH vakalarının Crocker ve Howat yöntemine göre AgNOR sayı ortalamaları en düşük ve en yüksek değerleri belirlendi (Tablo 1).

AgNOR sayıları tümör vakalarında 4.2 ile 13.16 arasında değişti. AgNOR sayısı patern skoru oluşturan her patern göz önünde tutulduğunda patern skor 6, 7, 8 ve 10'da fazla bulundu, en çok patern skor 9'da patern skor 3, 4, 5'dekilerle aynı oranda görüldü. Düşük patern skorlu tümörlerde AgNOR benekciklerinin üçlü dördü asosiasyonlar yaptığı (Resim 1) yüksek patern skorlu tümörlerde ise genelde disosiasyon olduğu (Resim 2) asosiasyon yapan gruplarda ise 15'e varan sayıda AgNOR benekciği bulunduğu belirlendi. Tüm tümör vakaları incelendiğinde patern skor ile Crocker ve Howat'a göre AgNOR sayıları arasında regresyon testi uygulandığında zayıf bir bağlantı bulundu (Crocker'e göre $r: 0.48, p < 0.01$, Howat'a göre $r: 0.38, P < 0.005$).

Tümörler disosiasyon derecesine göre student' t testiyle birbiriyle karşılaştırıldığında iyi ve orta derecede diferansiye tümörler arasında Crocker'e göre $P: 0.00005$ Howat'a göre $P: 0.00213$ bulundu. İyi ve az diferansiye tümörlerde yalnız Crocker yöntemine göre hafif bağlantı bulundu ($P: 0.0144$).



Resim 2. İyi diferansiye adenokarsinom vakasında az sayıda asosiy AgNOR benekcikleri (Prot No: 11202/93 AgNOR X 1250).



Resim 3. Az diferansiye adenokarsinom vakasında sayıca çok disosiy AgNOR benekcikleri (Prot No: 13132/84 AgNOR X 1250).

Orta ve az diferansiye tümörlerde ise anlamlı bir fark elde edilemedi.

PIN vakalarında tüm gradlarda AgNOR boyanması asosiasyon yapan 2'li 3'lü gruplar şeklinde izlendi. AgNOR benekcikleri PIN vakalarında Crocker'a göre en az 4,24, en fazla 11,34, Howat'a göre en az 2,68 en fazla 6,92 bulundu. Her iki sayım yöntemiyle de ağır PIN vakalarında (PIN 2-3) AgNOR sayısı PIN 1'e göre fazla izlendi. PIN gradı ile AgNOR sayısı arasındaki bağlantıyı araştırmak için yapılan regresyon testinde her iki yöntemle hafif bir ilişki saptandı (Crocker'a göre $r: 0.32$, $P<0.005$, Howat'a göre $r: 0.442$ $P<0.01$. Hafif ve ağır PIN'ler arasındaki fark anlamlı idi ($P<0.01$).

PIN ve tümör gruplarının AgNOR sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı idi (Crocker'e göre $P:0.000006$, Howat'a göre $P:0.0057$). Aynı yöntemle PIN 2-3 ile iyi diferansiye karsinomlar karşılaştırıldığında ise anlamlı sonuç elde edilemedi (Crocker'e göre $P: 0.3$, Howat'a göre $P: 0.2$).

5 vakalık AAH serimizde AgNOR sayısı az olup genelde ikili üçlü asosiasyonlar izlendi. Bu grubun iyi diferansiye tümörlerle karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunamadı (Crocker'a göre $P:0.4$, Howat'a göre $P: 0.2$).

Bulduğumuz değerleri kontrol amacıyla aldığımız prostat hiperplazisi grubunda ise AgNOR sayısı hem PIN hem de tümörlerden daha az sayıda idi ve asosiasyonlar göstermekteydi.

TARTIŞMA

Prostat karsinomlarının histopatolojik özellikleri ve prognozu arasındaki bağlantıyı araştırmaya yönelik ve değişik sınıflamalara dayanan pek çok çalışma vardır (8,15). Bu çalışmalardan uygulanabilirliği ve prognozla bağlantısı ideal olmamakla birlikte günümüzde yaygın olarak kullanılan WHO ve Gleason sınıflamalarıdır. AgNOR yöntemi hücre kinetiği yöntemleri içinde ucuz ve pratik olduğundan, retrospektif incelemelere olanak sağladığından, diğer yöntemlere göre daha yaygın olarak uygulama alanı bulmaktadır.

Çalışma kapsamına alınan 33 tümör vakamızda tümörün diferansiasyonu düştükçe AgNOR sayısının ve disosiasyonun arttığı gözlemlendi ($P<0.01$). Bu konuda yapılan çalışmaların çoğunda benzer sonuçlar elde edilmiştir (1,7,9,10,18).

Gleason sınıflamasının WHO'ya uyarladığımızda iyi ve orta derecede diferansiye tümörler arasında AgNOR sayısı açısından anlamlı bir fark elde edildi (Crocker'e göre $P: 0.000095$). Ancak iki grup arasında belirgin çakışma izlendiğinden ayırıcı tanıda tek kriter olarak kullanılamayacağı düşünüldü. İyi ve orta derecede diferansiye tümörler arasında zayıf bir fark mevcuttu (Crocker'a göre $P: 0.0144$). Orta ve az diferansiye tümörler arasındaise fark anlamlı bulunmadı. Bunun nedenini ise patern skoru 9 olan düşük AgNOR sayısına sahip iki vaka ile açıklamaktayız. Contractor (4) ve Lloyd (12)'da yaptıkları çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde az diferansiye tümörlerde AgNOR sayısının beklenen oranda artmadığını saptamışlardır.

Çalışmamızda aynı histopatolojik yapıya sahip tümörlerde farkı AgNOR sayıları olduğunu gördük (Örneğin patern skor 8'de AgNOR sayıları 8,31 ile 13,7 arasında değişmekteydi). Pavlakis'te yaptığı bir çalışmada aynı sonuçları bulmuş ve bu farklılığın prognozla bağlantılı olabileceğini öne sürmüştür. Bir başka çalışmada da prostat karsinomları prognozlarına göre iyi ve kötü olarak ikiye ayrılmış ve bu iki grup arasında istatistiksel açıdan belirgin AgNOR sayısı far-

kı saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak AgNOR yönteminin hücrenin proliferatif aktivitesi hakkındaki değişikliği ışık mikroskopik değişiklikler olmadan ortaya koyduğu ileri sürülmüştür.

Çalışma kapsamına aldığımız tümör PIN ve hiperplazi gruplarının AgNOR sayıları arasında çakışmalar olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmekteydi (Crocker'e göre PIN ve tümör için $P:0.00006$, PIN ve hiperplazi için $P:0.0003$, tümör ve hiperplazi için $P:0.000008$). Bu nedenle her üç grubun birbirinden ayrı olduğu kanısına varıldı. Bu veri bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla da desteklenmekteydi (6,13).

Ancak PIN 1 ve PIN 2-3 birbiri ile kıyaslandığında AgNOR sayısının anlamlı fark gösterdiği saptandı. PIN 2-3 ile iyi diferansiye adenokarsinom arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı için ayırıcı kullanılamayacağı sonucuna varıldı. Ayrıca Hansen'in (19) yaptığı bir çalışmada yalnız sayısal değil morfolojik olarak da tipik bir aterin olmadığı vurgulanmıştır. Az sayıda AAH vakamız genel olarak iyi diferansiye adenokarsinom ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

AgNOR ile ilgili çalışmalarda boyama ve sayma özellikleri açısından sorunlar bildirilmiştir. Örneğin her bölünme hatı aynı bloktan hazırlanan değişik kesitlerin standart zamanda AgNOR boyası olmadığı belirtilmiştir. Çalışmamızda boyama işleminde aynı sorunla karşılaşıldı ve her vakanın boyama zamanının tek tek mikroskop altında belirlenmesi gerekti. Gümüş artefaktı tiyosülfat uygulamasına karşın sorun yarattı, fakat AgNOR benekciklerinden küçük ve açık renk olduğu için sayım işlemini etkilemedi. Lloyd bazı vakalarda saydığı nukleusun tümör hücresine ait olup olmadığından kuşku duyduğunu bildirmiştir (12). Biz de özellikle yaygın infiltrasyon yapan yüksek gradlı vakalarda saydığımız nüvenin tümöre mi yoksa prostat stromasına mı ait olduğu konusunda kuşkuya düştük. Elde ettiğimiz verilere göre AgNOR yönteminin iyi ve orta derecede diferansiye tümörlerin ayırımında diğer kriterlerle birlikte kullanılabileceği, tümör, PIN ve hiperplazi gruplarında AgNOR değerlerinin farklı olduğu ve diğer parametrelerle birlikte tanıda fikir verebileceği, PIN'in hiperplaziden çok tümöre yakın bir grup olduğu sonucuna varıldı. Klinik olarak da davranışları farklı iki lezyon olan PIN 1 ve PIN 2-3'ün elde ettiğimiz AgNOR sayılarında bu iki lezyonun farklı iki grup olduğu sonucuna varıldı. İstatistiksel veriler gözönüne alındığında sayım yöntemi olarak Crocker'in Howat'a üstün olduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Alivizatos G, Pavlaki K, Giannopoulos A, et al. Nucleolar organizer regions in prostatic carcinomas. Comparison with flow cytometric analysis, tumor grade, stage and serum prostat specific antigen level. *Eur Urol* 1992; 21: 141-145.
2. Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1992; 23: 242-248.
3. Brawn PN. Adenosis of the prostate. A dysplastic lesion that can be confused with prostate adenocarcinoma. *Cancer* 1982; 49: 826-833.
4. Contractor H, Ruschhoff J, Hanisch T et al. Silver stained structures in prostatic carcinoma: Evaluation of diagnostic and prognostic relevance by automated image analysis. *Urol Int.* 1991; 46: 9-14.
5. Crocker J, Boldy DAR, Egan M S. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
6. Deschenes J, Weider N. Nucleolar organizer regions (NOR) in hyperplastic and neoplastic prostate disease. *A J Srg Pathol* 1990; 14: 1148-1155.
7. Graziedeh M, Sasaki Y, Oyune T et al. Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions. *Histopathology* 1991; 19: 369-372.
8. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer. *Hum Pathol* 1992;

- 23: 273-279.
9. Hansen AB, Ostergard B. Nucleoler organiser regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1990; 417: 9-13.
 10. Helpap B, Riede C. AgNOR analyses of prostate carcinomas of high and low malignancy. *Ver Dtsch Ges Pathol* 1993; 77: 93-97.
 11. Howat A J, Giri DP, Cottan DWK et al. Nucleoler organizer regions in spitz nevi and malignant melanoma. *Cancer* 1989; 63: 474-478.
 12. Lloyd SK, Jhonson CR, Brown IT. Nucleoler organizer regions in benign and malign prostatic disease. *Histopathol* 1991; 18: 449-462.
 13. Mamaveo S, Lundgen R, Elfving P et al. AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate. *Prostate* 1991; 18: 155-162.
 14. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia. A premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol* 1989; 17: 64-71.
 15. Mostofi F K, Sesterhen I, Sobin LH. Histologic typing of prostate tumors. In *International Histological Classification of Tumors*. No 22. World Health Organization, Geneva 1980.
 16. Mostofi F K, Sesterhen I A, Devis C J. Prostatic carcinoma: Problems in the interpretation of prostatic biopsies. *Hum Pathol* 1992; 23: 223-241.
 17. Nagle RB, Brawer MK, Kittersend et al. Ppenotipic relationships of prostatic intraepithial neoplasia to invasiv prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 1991; 138: 119-128.
 18. Pavlakis R, Alivizators G, Mitropeulos D, et al. Silver binding nucleoler organizer regions in benign and malignant prostatic lesions *Urol Int* 1992; 49: 137-140.
 19. Ploton D, Manager M, Jeanneson P et al: Improvement in staining and in the visualization of argyrophilic proteins of the nucleoler organizer region at optical level. *Histochemical Journal* 1986; 18: 5-14.
 20. Schned R A. Nucleoler organizer regions diagnosis of discriminators for the diagnosis of well differentiated adenocarcinoma of the prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1000-1004.