

MALİGN VE BENİGN MEME LEZYONLARINDA AgNOR

Yard. Doç. Dr. Figen ÖZTÜRK*, Doç. Dr. Turhan OKTEN*, Dr. H. Ali KAHYA*, Dr. Aykut ONURSEVER*

ÖZET: Gümüş boyama tekniği kullanılarak 30 meme lezyonunun (10 fibrokistik hastalık (FKH), 10 fibroadenom (FA), 10 invazif duktal karsinom (İDK) parafin kesitlerinde nükleolar düzenleyici bölgelerle ilişkili proteinler (AgNOR) çalışıldı. Benign meme lezyonları olarak kabul edilen FKH ve FA ile invazif duktal karsinomda nükleollerdeki küçük siyah noktacıklar olarak görülebilen AgNOR sayılarında farklılıklar izlendi. Benign lezyonlar arasında istatistiksel olarak AgNOR sayılarında farklılıklar izlenmedi. Malign lezyonlarda mitoz sayısı ile AgNOR sayıları arasında ilişki tesbit edemedik. Sonuç olarak bu yöntemin benign ve malign meme lezyonlarını ayırmada diğer yöntemlere göre daha ucuz ve kolay olduğunu, diğer hücre proliferasyonunu gösteren metotlarla birlikte uygulandığında ise prognoza yönelik daha güvenilir sonuçlar elde edileceğini düşündük.

ANAHTAR KELİMELE: Fibrokistik hastalık, fibroadenom, invazif duktal karsinom, AgNOR.

SUMMARY: AgNOR IN BENIGN AND MALIGN BREAST LASIONS. Using a silver staining technique, nucleolar organizer region-associated proteins (AgNORs) have been studied in 30 breast lesions (10 fibrocystic disease (FCD), 10 fibroadenoma (FA), 10 invasive ductal carcinoma (IDC)). A significant difference was found between the numbers of AgNORs in the nuclei of benign and malignant lesions, but there was no statistically difference between the numbers of AgNORs in benign breast lesions. As a result we think that this method is cheaper and easier than other techniques in differentiating benign and malignant breast lesions. Using together with other methods showing proliferating cells in breast carcinoma they will give more reliable results about prognosis.

KEY WORDS: Fibrocystic disease, fibroadenoma, invasive ductal carcinoma, AgNORs.

GİRİŞ

Nükleolar düzenleyici bölgeler (NOR) ribozomal RNA genleri ihtiva eden hücrelerin nükleollerinde bulunan DNA halkalarıdır. Ribozomal RNA genleri (rRNA) protein sentezinde önemli rol oynarlar. Bundan dolayı NOR'ların sayıları ve görünüşleri hücrelerin nükleer ve hücresel aktivitesini yansıtır (1-8). 1970'li yılların başından beri nükleolar düzenleyici bölgeler özellikle sitogenetikçiler tarafından trizomiler gibi belirli bazı genetik bozuklukların değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktaydı (5-8). Ancak histopatologlar tarafından fazla rağbet görmüyordu. 1986 yılında Ploton ve ark. tekniği geliştirerek oda sıcaklığında ve parafin kesitlerde uygulanabilirliğini sağlamasından sonra bu konuda çalışmalar artmıştır (6).

Nükleolar düzenleyici bölgeler gümüş kolloidal tekniği olan AgNOR yöntemi ile NOR'la ilgili proteinlerin argirofil özelliği kullanılarak gösterilmektedir. NOR'la ilgili bu proteinlerin yapısı tam olarak anlaşılmamakla birlikte, AgNOR yöntemi ile nükleolar yapılar ve nükleolar bölgelerin varyasyonlarının incelenmesi sağlanmaktadır (1-8). NOR ile ilişkili bu proteinler gümüş kolloidal teknikler kullanılarak boyandığında si-

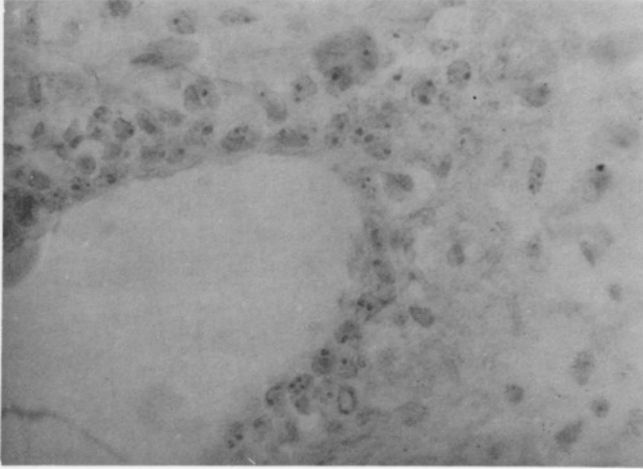
yah noktacıklar şeklinde görüntülenebilir. İn vitro yapılan çalışmalarda AgNOR sayı ve büyüklüklerinin rDNA aktivitesini yansıttıkları ve diferansiasyon derecesini gösterdikleri belirlenmiştir. Buna göre malign hadiselerde hücrenin aktivitesini yansıtan NOR sayılarının arttığı tesbit edilmiştir (2,4,5,7,8). Bizim bu çalışmada amacımız benign ve malign meme hastalıklarında AgNOR yöntemini kullanarak benign ve malign lezyonlar arasındaki boyanma farklılığını tesbit ederek ucuz ve rutin olarak kullanılabilen bu yöntem ile hücre proliferasyonu ve NOR sayıları arasındaki ilişkiyi incelemektir.

MATERYAL VE METOD

Çalışma grubu olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden rastgele seçilen benign ve malign meme hastalıklarına ait toplam 30 hastaya ait parafin bloklar kullanıldı. Vakalara rutin hematoksilen -eosin boyası ile 10 tanesi fibroadenom, 10 tanesi fibrokistik hastalık, 10 tanesi de invazif duktal karsinom tanısı verilmiştir. Fibrokistik hastalık tanısı alan vakalardan 5 tanesi ise hafif ve orta derecede hiperplazi gösteren fibrokistik hastalık olarak değerlendirilmiştir.

Bu parafin bloklarından hazırlanan kesitleri Smith ve arkadaşlarının kullandığı AgNOR yöntemi ile boyadık.

* Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri



Resim 1. Fibrokistik hastalık vakasında AgNOR noktacıkları (AgNOR X1000).

TABLO 1: FİBKOKİSTİK HASTALIK (FKH) VAKALARINDAN ELDE EDİLEN AgNOR SAYILARI

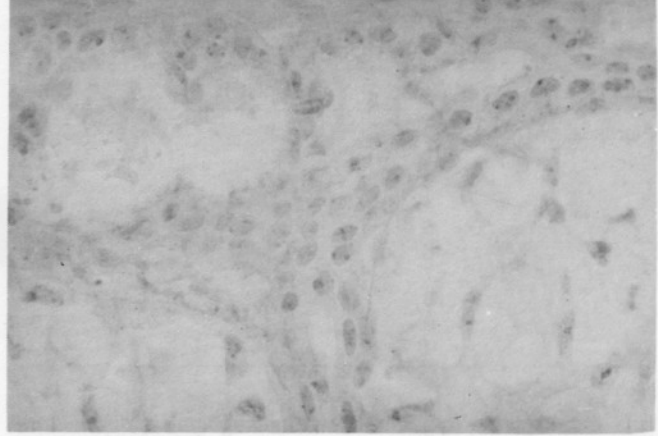
Tanı	Vaka no	Total AgNOR	X	SD
FKH (Epitelyal proliferasyon göstermeyen)	1	1.88		
	2	1.67		
	3	1.8		
	4	2.27		
	5	1.97		
FKH (Epitelyal proliferasyon göstermeyen)	6	1.77	1.958	0.225
	7	1.73		
	8	2.14		
	9	2.05		
	10	2.30		

Boyama Tekniği

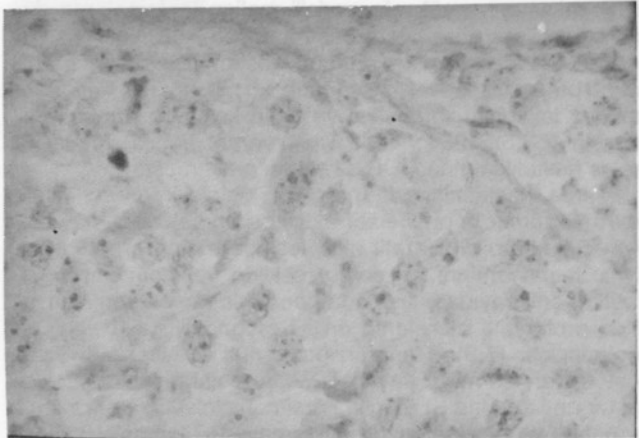
% 10'luk formalinle tesbit edilmiş ve parafin blokları hazırlanmış dokulardan 5-6 mikron kalınlığında kesitler yapıldı. 3-5 dakika ksilolde bekletildikten sonra değişik derecelerdeki etil alkolden geçirilerek rehidrate edildi. Deiyonize suda 8-10 dk. yıkandı. AgNOR kolusyonu hazırlamak için 2 gr toz jelatin 100 ml distile suda su banyosu içerisinde çözüldü ve üzerine 1 gr sulu formik asit ilave edildi. % 50 sulu gümüş nitrat ise 50 ml distile suda 25 gr gümüş nitrat kristali çözündürülerek elde edildi. Gümüş NOR (AgNOR) boyama solusyonu hazırlamak için sulu gümüş nitrat solusyonu ile jelatin solusyonu 2:1 oranında karıştırıldı. Hazırlanan kesitler karanlık ortamda ve oda sıcaklığında solusyon içerisinde 45 dk. bekletildi. Daha sonra deiyonize suda yıkandı ve etil alkolde dehidrate edilerek ksilole şeffaflandırıldı. DPX ile kapatıldı. Tüm kesitlerde rastgele seçilen sahalarda pozitif boyanma gösteren hücreler X100 büyütmede immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Her vakada 100 hücre sayıldı ve hücre başına ortalama AgNOR sayıları hesaplandı. Sonuçlar Student-t testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Benign meme hastalıklarından proliferasyon gösteren ve göstermeyen fibrokistik hastalık vakalarından elde edilen AgNOR değerleri 1.67 ile 2.3 arasında değişiyordu (ortalama 1.958) (Resim 1) (Tablo 1).



Resim 2. Fibroadenom vakasında AgNOR noktacıkları (AgNOR X1000).



Resim 3. İnvazif duktal karsinomda AgNOR noktacıkları (AgNOR X1000).

Fibroadenom vakalarında total AgNOR sayıları 1.5 ile 2.5 arasında değişiyordu (ortalama 1.87) (Resim 2) (Tablo 2). İnvazif duktal karsinom vakalarında total AgNOR sayıları 5.6 ile 11.49 arasında değişiyordu (ortalama 8.93) (Resim 3) (Tablo 3).

Epitelyal proliferasyon gösteren ve göstermeyen fibrokistik hastalık vakaları ile fibroadenom vakalarının AgNOR sayıları arasında istatistiksel olarak fark olmamasına rağmen invazif duktal karsinomun total AgNOR sayıları her iki benign meme lezyonundan istatistiksel olarak farklıydı (Tablo IV).

TARTIŞMA

Nükleolar düzenleyici bölgeler yapıları kesin olarak bilinmeyen NOR'la ilişkili proteinlerin argirofili özellikleri kullanılarak uzun yıllardan beri incelenmektedir (1-8). 1986 yılından bu yana ise parafin kesitlere uygulanabilen bu yöntem ile NOR'la ilgili proteinler üzerindeki sülfhidril gruplarına gümüş bağlanmaktadır (6). NOR'la ilgili olduğu öne sürülen proteinler RNA polimeraz I, C 213 protein, C 23'le ilişkili protein ve B 23 fosfoproteindir (1,2,5). rDNA'yı şifreleyen DNA halkaları olarak bilinen NOR'ların hücrelerin sentez ve metabolik aktivitesi ile ilişkisi olduğu öne sürülmektedir (1-8).

1986'da Ploton ve ark.'ın tekniğin parafin bloklara ve

TABLO 2: FİBROADENOM VAKALARINDA TOTAL AgNOR SAYILARI

Tanı	Vaka no	Total AgNOR	X	SD
Fibroadenom	1	1.6	1.87	0.42
	2	2.35		
	3	1.65		
	4	1.64		
	5	2.13		
	6	2.5		
	7	1.18		
	8	2.05		
	9	2.1		
	10	1.5		

oda sıcaklığında uygulanabilmesini sağlayan çalışmalarından sonra NOR'lar malign insan hücrelerinde araştırılmaya başlanılmıştır (6). 1987'de Crocker ve ark. non-Hodgkin lenfomaların parafin kesitlerinden oluşan büyük bir seride AgNOR çalışmış ve yüksek grade'li malign lenfomalarda düşük grade'lilere göre hücre başına düşen AgNOR sayısının belirgin oranda yüksek olduğunu göstermişlerdir (1). Daha sonra bu teknik çocukluk çağına küçük hücreli tümörleri, kutanöz lezyonlar, bronşiyal ve tiroid kansinomlarında çalışılmıştır (2,3,5). 1988 yılında Smith ve ark. benign ve malign meme hastalıklarında NOR sayılarını araştırmıştır (8).

Meme hastalıklarında prognoz histolojik grade, klinik devre ve tümörün proliferatif aktivitesi ile yakından ilişkilidir (7-8). Tümörün proliferatif aktivitesi ise tümörün potansiyel biyolojik davranışını en somut şekilde yansıtmaktadır (7). Yapıları çok sayıda çalışmada genellikle meme kansinomlarında proliferatif aktivitenin en iyi prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (7,8). Tümörün proliferatif aktivitesinin en iyi göstergeleri ise mitoz sayısı, DNA flow sitometrisi monoklonal bir antikor olan Ki 67 gibi immünohistokimyasal yöntemler pahalı ve her merkezde bulunmayan ekipmanla uygulanabilmektedir. Bu nedenle hiperplazi ve malignensi gibi hücrelerin aktif olduğu durumlarda hücre nükleollerindeki AgNOR sayılarındaki değişikliği değerlendirmek için ucuz ve rutin laboratuvar şartlarında uygulanabilen bir teknik olan AgNOR yönteminin kullanılması ve mitoz sayısının hesaplanması daha pratik olacaktır.

Bu çalışmada hiperplastik ve malign meme hastalıklarını inceledik. Sonuçta benign meme lezyonlarından FA ve FKH vakalarında AgNOR sayıları arasında istatistiksel olarak fark tesbit etmedik. FA ve FKH vakalarında mitotik figür izledik. Bulgularımız Raymond ve ark. ile Smith ve ark.'nın yaptığı çalışmalarla uygunluk göstermektedir (7,8).

Toplam AgNOR sayıları değerlendirildiğinde neoplastik meme hastalıkları ile benign meme hastalıkları arasında belirgin bir farklılık dikkati çekti (Tablo IV). Malign hastalıklarda mitoz sayısı da her 10 BBS'da 0.7 ile 1.2 arasında değişiyordu (Tablo 3). Buna karşılık mitoz sayısı ile AgNOR değerleri arasında ilişki tesbit etmedik. Çalışma grubu olarak seçtiğimiz vakaların klinik olarak takiplerini yapamadığımızdan dolayı yüksek AgNOR sayıları ile hastalığın prognozu

TABLO 3: İNVAZİF DUKTAL KARSİNOM VAKALARINDA TOTAL AgNOR SAYILARI VE MİTOTİK FİGÜR DEĞERLERİ

Tanı	Vaka no	Total AgNOR	Mitoz sayısı	X	SD
İnvaazif Duktal Karsinom	1	9.98	0.9	8.93	1.97
	2	9.7	1.5		
	3	11.49	1.1		
	4	8.2	1.4		
	5	5.6	1		
	6	6.70	0.7		
	7	8.49	0.9		
	8	10.5	1.2		
	9	11.2	1.2		
	10	7.4	1.1		

TABLO 4: FKH ve FA ORTALAMA AGNOR DEĞERLERİNİN İDK İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Tanı	Ortalama AGNOR	p
FKH	1.958	>0.05
FA	1.87	>0.05
IDK	8.93	<0.01

arasında ilişki kuramadık. Bununla birlikte AgNOR yöntemi ile hem malign hastalıkları benign hastalıklardan ayırmak mümkün olmakta hem de prognozu tayin etmek için diğer pahalı ve zor yöntemlere göre daha kullanışlı bir teknik olarak kullanılabilmektedir. Ancak yine de bu yöntem diğer hücre proliferasyonunu gösteren yöntemler ve morfolometrik çalışmalarla birlikte uygulandığında prognoza yönelik daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesi mümkün olur.

KAYNAKLAR

1. Crocker J., Nar P.: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *Journol of Pathology*, 44: 111-118 (1987).
2. Editorial. NORs-A new method for the pathologist. *Lancet*, 1: 1413-1414 (1987).
3. Egan M.J., Crocker J.: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. *Journal of Pathology*, 154: 247-253 (1988).
4. Howat A.J., Giri D.D., Cotton D., Slater D.N.: Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer*, 63: 474-478 (1989).
5. Leong A., Gilham P.: Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum Pathol*, 20: 257-262 (1989).
6. Ploton D., Menager M., Jeanesson P., Himber G., Pigeon F., Adnet J.: Improvement in the staining and visualisation of argyrophilic proteins of the nucleolar organising regions at the optical level. *Histochem J*, 18: 5-14 (1986).
7. Raymond W.A., Leong A.S.-Y.: Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol*, 20: 741-746 (1989).
8. Smith R., Crocker J.: Evaluation of nucleolar organizer region-Associated proteins in breast malignancy. *Histopathology*, 12: 113-125 (1988).