

BÖBREK HÜCRELİ KARSİNOM'UN NÜKLEER DERECELENDİRMESİNDE NOR SAYIMININ KATKISI

Dr. M. Akif DEMİR (*), Dr. Hakan POSTACI (*), Dr. Ali Rıza KANDİLOĞLU (*), Dr. Enver VARDAR (*)

ÖZET: Böbrek hücreli karsinomda (BHK) nükleer derece, özellikle böbrekte sınırlı tümörlerde değerli prognostik göstergedir. Nükleoler organizasyon bölgelerinin (NOR) sayımı, nükleer derece ve prognozla uyumluluğu son yıllarda tümör patolojisi gündeminde geniş yer tutan bir yöntemdir. Çalışmamızda, 43 böbrek hücreli karsinom olgusunda total ve globüler NOR sayım yöntemlerinin Thoenes ve Fuhrman derecelendirmelerindeki istatistiksel değeri araştırılmış ve pratikteki uygulanabilirliği tartışılmıştır. Thoenes derecelendirmesinde D-II ve D-III (total NOR için $p<0.001$, globüler NOR için $p<0.001$), Fuhrman derecelendirmesinde D-III ve D-IV arasındaki ilişkiler (total NOR için $p=0.002$, globüler NOR için $p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı iken düşük dereceler arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. NOR sayımının nükleer derecelendirmedeki özelliği gidermedeki yeri, yöntemin olumsuzluklarının giderilmesi ile olasıdır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Böbrek hücreli karsinom, NOR

SUMMARY: Nuclear grade is a valuable prognostic indicator for renal cell carcinomas, specially in tumors limited to the kidney. Counting of nucleolar organization regions (NOR) and its compatibility with the nuclear grade and prognosis has become popular in tumor pathology recently. In our series of 43 renal cell carcinomas graded according to Thoenes and Fuhrman's criteria, statistical and practical value of total and globular NOR counting methods were discussed. While an obvious statistical significance was found between G II and G III in Thoenes grading ($p<0.001$ for total NOR, $p<0.001$ for globular NOR) and between G III and G IV in Fuhrman grading ($p=0.002$ for total NOR, $p=0.001$ for globular NOR), there were no significant differences between lower grades. It is necessary to sort out the methodological problems in order to acknowledge that NOR counting is an objective criterion in nuclear grading.

KEY WORDS: Renal cell carcinoma, NOR

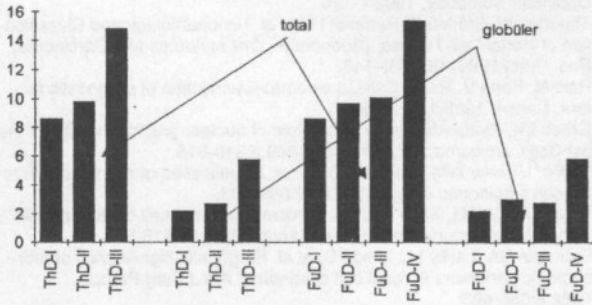
GİRİŞ

Nükleer derecelendirmedeki görsel özelliğin en aza indirilebilmesi için somut ve niceliksel bir yöntem olan NOR sayımı ile desteklenmesi önerilmiştir^{1,2}. NOR'lar, ribozomal

RNA'nın kodlandığı kromozomal segmentlerdir. RNA polimeraz, B23 protein ve C23 protein (nükleolin)'ler gibi nonhiston ve histon proteinlerle asosiyel haldedirler. Nonhiston proteinler üzerindeki karboksil gruplarının gümüş solusyonunu, gümüş mikronükleusları oluşturarak indirgediği düşünülmektedir. Bu mikronükleuslar daha sonra sistin ve sisteinin disülfid ve sülfhidril grubu bölgelerinde toplanarak daha büyük gümüş kümelenmeleri oluştururlar³.

* İZMİR, Buca Hastanesi Patoloji Servisi

GRAFİK 1 : FARKLI DERECELENDİRMELERDE FARKLI NOR SAYIM SONUÇLARIMIZ.



GEREÇ VE YÖNTEM

Retrospektif olarak incelenen 43 BHK olgusuna tek basamaklı arjirofilik bir boyama yöntemi olan NOR boyası1.4 yapıldı. % 10 luk formalin ile fikse, parafine gömülü örneklerin 3 mikronluk kesitleri deparafinizasyon ve hidrasyon basamaklarından sonra % 2 toz jelatin içeren % 1'lik formik asid solusyonundan bir, % 50'lik gümüş nitrat solusyonundan iki birimin karıştırılması ile elde edilen NOR solusyonunda, 24°C oda ısısında, karanlık ortamda, daldırma yöntemiyle, 35 dakika süreyle boyandı. Bol distile su ile yıkanan preparatlar dehidrasyon ve şeffaflamadan sonra balsam ile kapatıldı. Karşıt boya uygulanmadı.

Olgular, Thoenes ve Fuhrman kriterlerine göre ayrı ayrı derecelendirildi5,6. Fuhrman'a göre derecelendirme, nükleusları normal tubul epiteli nükleusu iriliğinde (~10µ), nükleolusları belirsiz ya da seçilemeyen hücreler (D-I); nükleer konturları düzensizlikler gösteren, irermiş nükleuslu (~15~), nükleolusları seçilebilen hücreler (D-II); büyük (~20 µ), nükleer membran düzensizlikleri belirgin, nükleolusları iri hücreler (D-III) ve garip, multilobe ya da multinükleer nükleuslu, kromatin ağı kaba hücreler (D-IV) şeklindedir. Thoenes'in önerdiği üç basamaklı derecelendirme, nükleus ya da nükleolusları normal tubul epiteli boyutlarında olan hücreler (D-I); normal tubul epiteli nükleusundan iri, yuvarlak ya da yuvarlaklığını yitirmiş, bazan invaginasyonları bulunan, kromatini kısmen ince, kısmen kaba, hiperkromatik nükleuslu, nükleolusları bir ya da bir kaç tane, merkezi ya da eksantrik yerleşimli hücreler ve sıklıkla multinükleer hücreler (D-II); oldukça irermiş ve dev boyutlara dek erişebilen nükleuslu, pleomorfizm ve polimorfizmin belirgin olduğu, kromatin ağı hiperkromatik, nükleolusları tek, iri ya da multipl hücreler (D-III) şeklindedir.

Çalışmamızda NOR'lar, ikisi sayısal değer taşımak üzere, üç ayrı grupta ele alınmıştır: 1. Net bir şekilde izlenen kümelerin ya da taneciklerin sayısı (globüler NOR) 2. Kümelerde ya da nükleolusların içinde ya da tek tek saçılmış halde, ayırdedilebilen tüm NOR taneciklerinin sayısı (total NOR) 3. NOR'ların baskın görünümüne göre "globüler, globül+saçılmış, saçılmış" olmak üzere gruplandığı deskriptif bir sınıflama.

Sayımları tamamlanan ve ortalaması alınan olgularda, student-t testi uygulanarak tanımlanan farklı sayım yöntemleri sonuçları ile nükleer derecelendirme yöntemleri arasındaki istatistiksel ilişki araştırılmıştır.

BULGULAR

Her derece için ortalama NOR sayıları ve dereceler ara-

TABLO 1 : NOR SAYIM SONUÇLARIMIZ

Derece		min.	Maks.	Ort.	St.sap.	Olgu
ThD-I	Total	2.86	14.92	8.6	3.20	22
ThD-II		5.61	17.86	9.77	2.94	14
ThD-III		12.1	17.58	14.84	1.90	6
ThD-I	Globüler 1.6	1.36	3.3	2.20	0.54	22
ThD-II		4.68	2.71	0.89	14	
ThD-III		4.6	7.36	5.77	1.05	6
FuD-I	Total	2.86	14.92	8.60	3.20	22
FuD-II		8.29	13.08	9.70	1.63	7
FuD-III		5.61	17.86	10.12	3.80	8
FuD-IV		13.72	17.58	15.39	1.50	5
FuD-I	Globüler	1.36	3.3	2.20	0.54	22
FuD-II		1.84	4.68	3.02	1.01	7
FuD-III		1.6	5.52	2.78	1.27	8
FuD-IV		4.6	7.36	5.82	1.16	5

TABLO 2 : NÜKLEER DERECELERE GÖRE NOR SAYIMLARININ İSTATİSTİKSEL İLİŞKİSİ.

	Globüler AgNOR	Total AgNOR
Thoenes		
DI-DII	p>0.05*	p>0.05*
DII-DIII	p<0.001	p<0.001
DI-DIII	p<0.001	P<0.001
DI-DIII	p<0.001	p<0.001
Fuhrman		
DI-DII	p>0.05*	p>0.05*
DII-DIII	p>0.05*	p>0.05*
DIII-DIV	p=0.001	p<0.01
DI-DIII	p>0.05*	p>0.05*
DI-DIV	p<0.01	p<0.001
DII-DIV	p<0.01	p<0.01
DII+DIII-DIV	p<0.01	p<0.001
DII+DIII-DI	p>0.01	p>0.05*
DI+DII-DIII	p>0.05*	p>0.05*
DI+DII-DIV	p<0.01	p<0.001

* İstatistiksel olarak anlamsız.

sındaki istatistiksel ilişki tablo I-II ve grafik I'de verilmiştir. Ayrıca NOR'ların deskriptif sınıflamasında, her iki nükleer derecelendirme sisteminde de düşük derecelilerde globüler görünümün, derece yükseldikçe "saçılmış" görünümün egemen olduğu izlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kümeler oluşturan NOR'ların ayırdedilebilmelerindeki güçlük ve öznellik nedeniyle bazı araştırmacılar yalnızca net bir şekilde, kolayca gözlenebilen siyah taneciklerin sayılmasını ; bazı araştırmacılar ise NOR küme ya da yığınları içindeki tüm NOR taneciklerinin sayılması gerektiğini savunurken üçüncü bir grup NOR sayımının "alan'a düşen birim" temeline dayandırılmasını önermiştir1,4. Globüler ve total NOR sayımlarının önemli farklılığı, globüler sayımda kümeler ya da nükleoluslar içindeki taneciklerin sayılmaması ve sonuçların düşük çıkmasıdır. Bu sayım yöntemlerinin farklılıklarının yol açtığı belirgin sonuç tutarsızlıkları kaynaklarda da dikkati çekmektedir7.

Çalışmamızda her iki derecelendirme yönteminde ve

TABLO 3 : KAYNAKLARDAKİ DEĞİŞİK NOR DEĞERLERİ İLE KARŞILAŞTIRMA⁷

Ruschoff ark.1	ve Ort. NOR	Delahunt ark.12	ve Ort. NOR	Pich ark.10	ve Ort. NOR	Yang ve ark.9	BHK derece	Ort. NOR	SSK-Buca Hastanesi	BHK derece	Ort. NOR glob	BHK derece	NOR total
BHK derece *		BHK derece **		BHK derece **		BHK derece				BHK derece		BHK derece	
1	4.56	1	3.27	1	5.35	1	1.90	1***	2.20	1***			8.60
2	6.90	2	6.28	2	5.92	2	2.43	2	2.71	2			9.77
3	9.48	3	9.24	3	7.99	3	2.90	3.	5.77	3			14.84
						1	1.88	1****	2.20	1****			8.60
						2	2.32	2	3.02	2			9.70
						3	2.70	3	2.78	3			10.12
						4	3.10	4	5.82	4			15.39

* Derecelendirme sistemi belirtilmemiş
 ** Delahunt ve Nacey derecelendirmesi

*** Thoenes ve ark.'na göre derecelendirme
 **** Fuhrman ve ark.'na göre derecelendirme

her iki NOR sayım yönteminde düşük nükleer dereceler arasındaki NOR değerleri istatistiksel anlam taşımamaktadır. Globüler ve total NOR sayımlarının istatistiksel anlamlılıkları karşılaştırıldığında belirgin bir fark görülmektedir.

Delahunt ve arkadaşları, NOR sayısı düşük olan lokalize (Evre I-II) tümörlerde 5 yıllık sağkalım oranının hemen hemen % 100 olduğunu ve NOR sayısının daha yüksek olduğu olgularda mortalitenin arttığını; Evre III ve IV olgularda NOR sayısı ortalama 3'ün altında ise, prognoz kötü de olsa sağkalım süresinde belirgin artım olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu sonuçlara dayanarak, aynı evredeki tümörlerin farklı davranış biçimlerine açıklama getirdiklerini savunan ekip, tümör evrelemesi yanısıra NOR sayısının, evreden bağımsız olarak hem lokalize, hem metastatik BHK'larda prognostik bilgi vereceğini önermişlerdir^{7,8}. Yang ve arkadaşları ise serilerinde, sağkalım ve NOR sayılarının sınıflaması arasında anlamlı istatistiksel ilişki saptamamışlardır⁹. Ayrıca, proliferatif indeks olarak Ki-67 skorunun daha değerli olduğu, NOR sayımı ile histolojik derece, patolojik evre arasında korelasyon bulunmadığı da bildirilmiştir¹⁰. Ancak, değişik ekiplerin sayım sonuçlarındaki farklılıklar da belirgindir (tablo III).

Çalışmamızda globüler sayım sonuçları (sayım aralığı 1.36-7.36), Yang'ın sonuçları ile (1.22-6.91) oldukça uyumludur. Total NOR sayım yönteminde sayım aralığımız 2.86-17.86 arasındadır ve Delahunt'un sayım aralığı ile (1.77-15.06) benzeşmekle birlikte derecelere göre ortalamaları (sırasıyla 3.27, 6.28, 9.24) ile bizim ortalamalarımız (8.6, 9.77, 14.84) farklılık taşımaktadır. Deskriptif sınıflamada gözlediğimiz nükleer derece artımı ile birlikte saçılmış NOR egemenliğini diğer araştırmalar da desteklemektedir^{1,2}.

Yöntemden kaynaklanan bazı sorunlar sayım sonuçlarının farklılığına yol açmaktadır. Kesit kalınlığı, doku tesbitinde kullanılan solusyon tipi¹¹, boyama ortamının ışık ve ısı koşulları, süresinin kısalığı ya da uzunluğu, seçilen sayım yöntemi, sayılacak hücre ya da alanın seçimi ve tüm uğraşlara karşın zemine çökebilin artefakt gümüş tanecikleri,

NOR yöntemi ile elde edilen sonuçların patologlar ve klinisyenler arasında ortak bir dil olarak algılanmasını önleyen önemli etkenlerdir.

Proliferatif bir indeksi yansıttığı, yaygın olarak benimsenmiş olmasına karşın, nükleoler organizasyon bölgelerinin değerlendirilmesinde ve evrensel nitelik kazanmasında, laboratuvar koşullarından, sayım biçimine değin standardize edilmesi gereken pek çok yön bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ruschoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C: Nucleolar Organizer Regions (NORs): Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol Res Pract* 1989; 185:878-885
2. Yang AH, Wang TY, Liu CH: Comparative study of the prognostic value of nuclear grade and silver-binding nucleolar organizer region in renal cell carcinomas. *J Pathol* 1992; 166: 157-161.
3. Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988; 155:95-96
4. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
5. Strohmeyer T, Ackerman R: Classic and modern prognostic factors in renal cell carcinoma. Review of the literature. *Urol Int* 199; 47:203-312.
6. Thoenes W, Störkel St, Rumpelt HJ: Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas)—The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Path Res Pract* 1986; 181: 125-143.
7. Delahunt B, bethwaite PB, Nacey JN, Ribas JL: Variation in AgNOR scores for renal cell carcinoma. *J Pathol* 199; 168: 424-426 (letter).
8. Delahunt B, Ribas JL, Nacey JN, Bethwaite PB.: Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. *J Pathol* 1991; 163: 31-37.
9. Yang AH, ang TY, Liu CH: Comparative study of the prognostic value of nuclear grade and silver binding nucleolar organizer region in renal cell carcinomas. *J Pathol* 1992; 166: 157-161.
10. Pich A, Valente G, Azzoni L, Stramignoni A: Argyrophilic nucleolar organizer region counts and Ki-67 scores in human renal cell carcinoma. *Path Res Pract* 1991; 187: 482-486.
11. Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J: The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J Pathol* 1988; 155:109-112.
12. Delahnt B, Nacey JN, Hammett GD, Fratter WJ: Nucleolar organizing regions in renal cell carcinoma, renal oncocytoma and renal adenoma.: *Anal Cell Pthol* 1989; 1 (3): 185-190.