

SELİM SERVİKS LEZYONLARI VE DISPLAZİLERİNDE PROGNOSTİK FAKTÖRLERDEN PCNA VE AGNOR'UN DEĞERLENDİRİLMESİ

Uz. Dr. A. CENNET (*), Uz. Dr. G. BARUT (*), Uz. Dr. F. ATAY (*), N. DEMİRBAĞ (*)

ÖZET: Serviks displazisi, epitelde atipik sitolojik özelliklerin varlığında kullanılan üzerinde çok tartışmalar ve yayınlar yapılan basit bir sözcük gibi ise de halen sınıflamasında, seyrinde, tedavi şeklinde ortak bir payda oluşturulamayan bir durumdur. Bu konuda çok araştırma yapılması gerektiğinden, faydalı olabileceği amacıyla selim serviks lezyonu ve displazisi olan toplam 41 vaka yeniden değerlendirildi, bu vakaların tümüne PCNA ve AgNOR reaktifleri uygulandı. Hastalık gruplarında kollum epiteli alt, orta ve üst olmak üzere 3 eşit parçaya bölünerek, her 1/3 bölümde tüm hücreler ve reaktiflerimiz için pozitif olan hücreler ayrı ayrı sayıldı. Her vakada ardışık olarak dört alan incelendi. Vaka gruplarında, tek ve küme yapmış AgNOR taneciklerinin birbirine oranında hesap edildi. Normal serviks epiteli, skuamöz metaplazi, SİN-1, SİN-2 ve SİN-3 vakalarında hem PCNA hemde AgNOR için, tüm tabakalarda bazılarında minimald e olsa, mutlaka bir artış tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELE: Serviks, displazi, PCNA, AgNOR.

SUMMARY: There are a lot of studies and publications on cervical dysplasia which is a term used to define the atypical changes of the cervical epithelium but there is still a debate on the classification and the therapeutic models. 41 cases of benign cervical lesions and cervical dysplasia were reexamined and the sections from the representative blocks were treated with AgNOR reactive and PCNA immunohistochemistry. In all series, the collum epithelium were divided into superior, medium and inferior portions and each portion was evaluated separately. In each case four microscopic fields were examined sequentially. An increase of both PCNA and AgNOR reactivity were detected almost always in all portions of the cases from normal cervical epithelium to squamous metaplasia, CIN-1, CIN-2, CIN-3, in orderly.

GİRİŞ

SİN-1'in, SİN-2'nin; SİN-3'ün karsinom gelişme riskini ve hangi evrede geri döneceği kesin verilerle bilinmemektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar daha çok hücre kinetiğine yöneliktir.

Nükleusla ilgili çalışmalardan olan, hücrelerin DNA zincirinde yer alan rRNA genetik mesajını taşıyan bölgeler rRNA üretimini sağlarlar, bu özelleşmiş bölgelere Nükleolus Organize Edici Bölgeler (NORs) adı verilir (1, 2, 3, 4, 5, 6). AgNOR yöntemi, NOR ile ilişkili proteinlerin gümüşle bağlanarak gösterilmesi esasına dayanmaktadır (3). Nükleusla ilgili bir diğer çalışma DNA polimeraz deltanın yardımcı proteini olan ve hücre çoğalmasının başlatılmasında önemli bir rol oynayan PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dir (7). Bu G1 fazı sonunda artmaya başlayan S fazı süresince en

yüksek düzeye erişen bir proteindir (8,9).

GEREÇ VE YÖNTEM

İncelediğimiz vakaların 12 tanesi servikste skuamöz metaplazi, 7 tanesi SİN-1, 10 tanesi SİN-2 ve 7 tanesi SİN-3 tanısı almıştır. Doku örnekleri alkol veya % 10'luk formaldehide 4-48 saat arasında tespit edilip, rutin takip yöntemleri uygulandı. Kesitlerin bir tanesine anti-PCNA monoklonal antikor PC 10 ile streptavidin biotin AP tekniği, diğeri ise AgNOR boyama yöntemi uygulandı.

Hem PCNA hem de AgNOR için kesitlerde teşhise uygun alanlar seçildi, immersiyon objektifi kullanılarak tüm hücreler ve pozitif boyanan hücreler sayıldı. Ardışık olarak her preparat için dört immersiyon alanı epitelin tüm kalınlığı boyunca alt 1/3, orta 1/3 ve üst 1/3 baz alınarak ayrı ayrı değerlendirildi. Her 1/3'te tüm hücreler sayıldı ve PCNA için granüler veya diffüz boyanan hücreler ayırt edilmeksizin tespit edildi. 1/3 kuralı AgNOR içinde uygulanmakla birlikte,

* Haseki Hastanesi Patoloji Servisi

TABLO 1 : VAKA GRUBLARINDA ORTALAMA VE STANDARD SAPMALAR (PCNA)

	ALT 1/3 PCNA		ORTA 1/3 PCNA		ÜST 1/3 PCNA	
NORMAL KOLLUM	4.58	3.052	0.81	1.096	0.13	0.295
SKU. METAPLAZİ	7.97	4.765	2.40	2.257	0.68	1.167
SİN - 1	11.88	5.502	9.86	12.546	2.90	5.578
SİN - 2	17.56	12.249	20.74	13.126	6.73	5.305
SİN - 3	26.29	12.881	28.24	18.044	22.00	17.458
	a	b	a	b	a	b

TABLO 2 : VAKA GRUBLARINDA BENEKÇİKLERİN KARŞILAŞTIRILMASI (AgNOR)

	TEK BENEKLER	PARÇALILAR	BİRBİRİNE ORANI
NORMAL KOLLUM	0.68	0.56	1.21
SKU. METAPLAZİ	1.15	0.28	4.11
SİN - 1	1.53	0.36	4.25
SİN - 2	2.52	0.54	4.67
SİN - 3	2.12	1.82	1.16

TABLO 3 : VAKA GRUBLARINDA ORTALAMA VE STANDARD SAPMALAR (AgNOR)

	ALT 1/3 AgNOR		ORTA 1/3 AgNOR		ÜST 1/3 AgNOR	
NORMAL KOLLUM	1.69	0.517	1.04	0.219	0.69	0.237
SKU. METAPLAZİ	1.76	0.428	1.29	0.248	1.08	0.226
SİN - 1	2.40	0.486	1.84	0.377	1.44	0.504
SİN - 2	2.91	0.840	2.45	0.724	2.10	0.593
SİN - 3	4.41	1.244	4.22	0.838	3.78	0.908
	a	b	a	b	a	b

a : Ortalama sonuçlar
b : Standard sapmalar

AgNOR'da tek küçük benekler birer birer sayılmış ve birbiriyle ilişkili küçük beneklerin yaptığı kümelerde bir benekçik olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

AgNOR için verdiğimiz rakamlar bir hücreye düşen benekçikleri, PCNA için verdiğimiz sayılar ise 100 hücrede tespit edilen bulguların ifadesidir.

PCNA BULGULARI

Normal serviks epitelinde elde ettiğimiz sonuçlar, diğer hastalık gruplarına göre, her 1/3 bölümde en düşük sayısal verilerdir. Skuamöz metaplazi vakalarındaki sonuçlarımız normal serviks epitelin yaklaşık iki katı kadardır. Bu artış özellikle orta 1/3 kısımda daha belirgin olup alt 1/3 tabakada da kayda değer nitelikteydi. SİN-1 olgularında hem normal serviks epiteli hem de skuamöz metaplazi vakalarına göre her katmanda yüksek olmasına rağmen özellikle orta ve üst 1/3 bölümde dikkat çekici bir şekilde artış yönündeydi. SİN-2 olgularımızdaki sonuçlarımız SİN-1'e göre yaklaşık iki kat yüksekti ve bu artış en fazla orta 1/3 tabakada tespit edildi. SİN-3 vakalarında en bariz özellik, üst 1/3 tabakada pozitiflik oranının diğer olgulara göre çok yüksek olmasıydı.

Özetle PCNA ile elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 1 de görülmektedir. Skuamöz metaplazi ve SİN-1'de orta 1/3, SİN-2 de orta ve üst 1/3, SİN-3 de üst 1/3 bölümlerde PCNA oranlarında anlamlı bir artış olduğu görülmektedir.

AgNOR BULGULARI

Normal serviks epitelinde ortalama her hücrede tanecik sayısı 1.22 olup alt 1/3 tabakada epitelin diğer bölümlerine göre daha yüksek olarak bulundu. Skuamöz metaplazide elde ettiğimiz sonuçlar normal serviks epitelinde bulduğumuz rakamlara oldukça yakın olup ihmal edilebilecek ölçüde bir artış göstermekteydi. SİN-1 ve SİN-2 olgularında tespit edilen sayısal değerler skuamöz metaplaziye göre yükseklik gösteriyordu ancak bu artış önemli düzeyde değildi. SİN-3 olgularındaki elde ettiğimiz sayılar SİN-2 olgularına göre yaklaşık iki kat yüksek olarak bulundu, bu sonuç diğer vaka gruplarında elde ettiğimiz sonuçlardan belirgin olarak bir farklılık arz ediyordu. Hastalık gruplarında, değerlendirdiğimiz benekçikleri sayılabilecek şekilde olanlar ve sayılamayacak bir şekilde birarada bulunanlar olarak ikiye ayırdık. Bunlara tek benekler ve parçalılar ismini verdik. Bu beneklerin birbirine oranı, normal serviks epitelinde ve SİN-3 vakalarında birbirine çok yakın; skuamöz metaplazi, SİN-1 ve SİN-2 vakalarında yaklaşık olarak dört katı şeklinde tespit ettik (Tablo 2).

Özetle AgNOR ile elde ettiğimiz sonuçlara (Tablo 3) baktığımızda SİN-3 dışındaki vaka gruplarında anlamlı sonuçlar bulmamıza rağmen SİN-3 olgularındaki artışın belirgin olduğu görülmektedir.

TARTIŞMA

Vaka gruplarına uyguladığımız sayım işlemi, literatürdeki benzer araştırmalarda uygulanana benzerlik göstermesine rağmen biz epiteli üç kısma ayırıp ayrı ayrı değerlendirdiğimiz için elde ettiğimiz tüm sonuçları karşılaştırmamız mümkün olamamıştır (10, 1, 12, 13).

Normal serviks epitelinde PCNA için elde ettiğimiz sonuçlar sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 4.58, 0.81, 0.13 idi ($p < 0.06$). Literatürde normal servikste yapılan çalışmalarda K.R.Mittal ve arkadaşları alt 1/3 bölümde pozitif boyanmayı %4.5 olarak tespit etmişler, orta ve üst 1/3 bölümde pozitif boyanma görmemişlerdir (11). M.S.Shurbaji ve arkadaşları normal serviks epitelinde boyanmayı sadece bazal tabakada izlemişlerdir (10). Biz çalışmamızda alt 1/3 tabakada boyanmayı çok yüksek olarak bulduk. Üst 2/3 kısımda pozitif boyanma ihmal edilecek düzeyde olup bu verilerle literatür bilgileri uyum göstermektedir.

Normal serviks epitelinde AgNOR için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabaka için 1.69, 1.04, 0.69 sonuçlarını elde ettik ($p < 0.05$). Literatürde D.C. Rowlands normal serviks epitelinde basal tabakada tanecik sayısını ortalama 2.14 olarak bulmuştur (14). Bizim alt 1/3 tabakada bulduğumuz değer daha düşüktür.

Skuamöz metaplazide PCNA için elde ettiğimiz sonuçlar sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabaka için 7.97, 2.40, 0.68 dir

($p<0.30$). K.R.Mittal ve arkadaşları bazal hücrelerde %3.3 pozitif boyanma bulmuşlardır, aynı zamanda 11 vakanın sadece 2 tanesinde orta 1/3 tabakada boyanma görmüşlerdir (11). Biz çalışmamızda alt 1/3 kısımda daha yüksek pozitif boyanma bulduk ve 12 vakamızın 7 tanesinde orta 1/3 tabakada boyanma tespit ettik. Bu sonuçlar literatür bulgularına göre yüksektir.

Skuamöz metaplazi vakalarında AgNOR için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakalarda 1.76, 1.29, 10.8 sonuçlarını bulduk ($p<0.002$). Literatürde bu tür çalışma bulunamamıştır.

Servikste SİN-1 olgularında PCNA için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 11.88, 9.86, 2.90 sonuçlarını elde ettik ($p<0.01$). K.R.Mittal ve arkadaşları bir vakada alt 1/3, iki vakada orta 1/3 tabakada boyanma bulmuşlardır (11). M.S.Shurbaji ve arkadaşları PCNA için derecelendirme sistemini kullanmışlar ve bazal tabakada sınırlı ise grade 0, parabazal tabakada ise grade-1, intermedier tabakada ise grade-2, süperfisial tabakada ise grade-3 olarak yorumlamışlardır (10). Bu sistemi biz kendi çalışmamıza adapte edersek, grade-0 ve grade-1 alt 1/3, grade-2 orta 1/3, grade-3 üst 1/3 olarak kabul edebiliriz. Bu durumda SİN-1 vakalarında alt 1/3 kısmında en fazla, orta 1/3 kısmında daha az, üst 1/3 kısmında en az PCNA pozitif hücreler şeklindeki tespiti-mizin literatür bulgularıyla da uyumluluk gösterdiği anlaşılar.

Servikste SİN-1 olgularında AgNOR için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 2.40, 1.84, 1.44 sonuçlarını bulduk ($p<0.03$). D.C. Rowland SİN-1 olgularında 2.11 sonucunu bulmuştur (14). Bu araştırıcı, SİN-1 sonuçlarını normal serviks epitel sonuçlarından daha düşük olarak bulmuştur. M.Egan ve arkadaşları SİN-1 vakalarında ortalama 2.30 sonucunu bulmuşlardır (15). Biz çalışmamızda ortalama AgNOR değerini 1.95 olarak tespit ettik. O. Leopardi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim çalışmamızla uygunluk göstermemektedir (13).

Servikste SİN-2 vakalarında PCNA için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 17.56, 20.74, 6.73 değerlerini bulduk ($p<0.35$). M.S.Shurbaji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4 adet grade-2, 14 adet grade-3 PCNA ile boyanma saptamışlardır (10). Bu bizim çalışmamızla hiç uyumlu değildir. Çünkü bizim orta 1/3 tabakada elde ettiğimiz sonuçlar, üst 1/3 tabakada elde ettiğimizden üç kat yüksekti; bu yükseklik bütün SİN-2 vakalarında izlenmişti. 1977 yılında yapılan bir çalışmada SİN'in derecesi yükseldikçe mitoz sayısında doğru orantılı bir şekilde artış olduğu gösterilmiştir (16). K.R.Mittal ve arkadaşları yaptığı çalışmada alt ve orta 1/3 kısımda pozitif boyanma bulmuşlardır (11).

Bu araştırma bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

Servikste SİN-2 vakalarında AgNOR için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 2.91, 2.45, 2.10 sonucunu bulduk ($p<0.07$). D.C. Rowlands SİN-2 vakalarında ortalama 2.27 sonucunu bulmuştur (14). Bizim ortalama değerimiz 2.52 idi. M. Egan ve arkadaşlar SİN-2 olgularında ortalama değerlerini 3.5 olarak bulmuşlardır (15). Bu çalışmada SİN-1 sonuçları gibi SİN-2 sonuçları da bizim çalışmamıza göre yüksek olarak bulunmuştur.

Servikste SİN-3 vakalarında PCNA için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 26.29, 28.24, 22.00 değerlerini bulduk ($p<0.03$). M.S.Shurbaji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PCNA grade-1'den bir tane, grade-2'den üç tane, grade-3'ten dokuz tane bulmuşlardır (10). Bunu adapte ettiğimiz zaman, bizim sonuçlarımızla uyumludur. K.R.Mittal ve arkadaşları SİN-3 vakalarında her üç tabakada pozitif boyanma tespit etmişlerdir (11). Bu bizim çalışmamızla da uyumludur.

Servikste SİN-3 vakalarında AgNOR için sırasıyla alt, orta, üst 1/3 tabakada 4.41, 4.22, 3.78 sonuçlarını bulduk ($p<0.05$). D.C. Rowland SİN-3 vakalarında ortalama 2.86 sonucunu bulmuştur (14), bu sonuç kendi çalışmasında SİN-2'ye göre yüksektir ancak belirgin bir artış şeklinde değildir. Bizim çalışmamızda SİN-2 ve SİN-3 olgularında AgNOR değerleri arasında belirgin bir yükselme tespit edilmiştir. M. Egan ve arkadaşları SİN-3 olgularında ortalama 4.7 rakamını bulmuştur ve sonuçları SİN ilerledikçe benekçik sayısında artma şeklindedir (15). Literatürde bulunan diğer çalışmalarda, SİN-2 ile SİN-3 arasında AgNOR sayılarında ki artış bir miktar görülmekle birlikte bizim çalışmamızda olduğu kadar belirgin değildir.

Literatürde servikste aynı vaka grublarına hem PCNA hemde AgNOR reaktifleri uygulanarak yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak başka hastalıklarda bu tip çalışmalar yapılmıştır (17, 18, 19).

KAYNAKLAR

- Lewis G.T.S., Letter's to editor: Demonstration of AgNOR related proteins in microwave-fixed tissues. *Journal of Pathology* 1988; 156: 352.
- Ruschoff J., Plate K.H., Contractor H., Kern S., Zeilmerman R., Thomas C: Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: A contribution to standardization. *Journal of Pathology* 1990; 161: 113-118.
- Smith P.J., Skilbeck N., Harrison A., Crocker J: The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *Journal of Pathology* 1988; 155: 109-112.
- Underwood J.C.E., Giri D.D: Nucleolar organizer region as diagnostic discriminants for malignancy. *Journal of Pathology* 1988; 155: 95-96.
- Crocker J, Paramjit N: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *Journal of Pathology* 1987; 151: 115-118.
- Giri D.D., Nottingham J.F., Lawry J., Dundas S.A.C., Underwood J.C.E: Silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlation with ploidy and growth phase by DNA flowcytometry. *Journal of Pathology* 1989; 157: 307-313.
- Garcia R.L., Coltrera M.D., Gown A.M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA / Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flowcytometric analysis. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-739.
- Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., et al: Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
- Robbins B.A., Delavega D., Ogata K., Tan E.M., Nakamura R.M: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845.
- Muhammed S.S., Sandra K.B., Thane S.T: Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and benign cervical epithelium. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 22-26.
- Khush R.M., Rita I.D., Sunanda G: Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 117-122.
- Genova G., Guddo F., Vita C., Arena N., Morelio V., Tomasino R. M: Argrophilic nucleoproteins of the cervical epithelium in HPV infection and intraepithelial neoplasia. *Pathologia* 1991; 83 (1086): 461-466.
- Leopardi O., Colavecchio M., Dede A: Value of AgNOR counts in cervical pathology. *Eur J Gynaecol Oncol* 1992; 13 (6): 539-544.
- Rowlands D.C: Nucleolar organizer region in cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Clinical Pathology* 1988; 41: 1200-1202.
- Egan M., Freeth M., Crocker J: Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervix and the size and number of nucleolar organizer regions. *Gynecologic Oncology* 1990; 36: 30-33.
- Chi C.H., Rubio C.A., Lagerlof B: The frequency and distribution of mitotic figures in dysplasia and carcinoma in situ. *Cancer* 1977; 39: 1218-1223.
- Sakr W.A., Sarkar F.H., Sreepathi P., Drozdowicz S., Crissman J.D: Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA, and SPF. *Prostate* 1993; 22 (2): 147-154.
- Yu C.C., Fletcher C.D., Newman P.L., Goodlad J.R., Burton J.C., Levison D.A: A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 1992; 166 (2): 147-152.
- Smith F.G., Murray P.G., Crocker J: Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 1993; 46 (1): 28-31.