

SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL NEOPLAZİLERDE NÜKLEOLAR ORGANİZER BÖLGELER

Uzm. Dr. Nezahat YILDIRIM*, Doç. Dr. A. Zuhale YUMBUL***, Doç. Dr. Hayreddin YEKELER**,
Uzm. Dr. İ. Hanifi ÖZERCAN**, Araş. Gör. Dr. Cengiz DOĞAN**, Araş. Gör. Dr. Ali Deniz ERKMEN****

ÖZET: 1988-1994 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen 40 adet histerektomi ve biyopsi materyali çalışmaya alındı. Kronik servisit, CIN I, CIN II ve CIN III eşit sayıda olup, her lezyondan 10 olgu incelendi. Tüm olguların parafin kesitlerine AgNOR yöntemi uygulandı. Proliferatif aktivitenin tayininde AgNOR yöntemi ile nüve içerisindeki siyah benekçikler sayıldı. Skuamöz epitel hücre nüvelerindeki AgNOR sayıları değerlendirildi ve her bir materyel için ortalama AgNOR değerleri hesaplandı. Sonuç olarak, servikal displazi derecesinin artışına paralel olarak ortalama AgNOR sayılarında artış tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELEER: Servikal İntraepitelyal Neoplazi, AgNOR.

SUMMARY: NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA: We have studied on 40 hysterectomy and biopsy materials retrieved from files of Fırat University Medical Faculty pathology department and Ege University Medical Faculty, pathology department between 1988-1994. Chronic cervicitis, CIN I, CIN II and CIN III were in equal number and 10 cases of each lesion were examined. AgNOR method was applied to paraffin sections of all cases. Determination of proliferative activity was done according to the AgNOR method that stains the NORs as multiple black dots within nuclei. The number of AgNORs in the nuclei of squamous cells was counted and the average number of AgNORs in each cell calculated for each specimen. In conclusion, the mean number of AgNORs increased with increasing grades of cervical dysplasia.

KEY WORDS: Cervical intraepithelial Neoplasia, AgNOR.

GİRİŞ

Kadınlarda en sık görülen kanserler arasında ikinci sırada yer alan serviks kanseri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve genç yaşlarda önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (1). Erken evrede tanı koymada proliferasyon belirleyiciler kullanılmaktadır. Basit ve ekonomik olan AgNOR yöntemi bu nedenle son yıllarda önem kazanmıştır.

AgNOR yöntemi rDNA segmentlerinde bulunan bazı nükleolar asidik fosfoproteinlerin gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopunda incelenmesini sağlar. Çeşitli çalışmalarda normal, benign ve malign tümöral hücreler arasında AgNOR sayı ve dağılımında farklılıklar olduğu ileri sürülmektedir (2-7).

AgNOR yöntemi; Ki-67 immünoreaktivitesi, Bromodeoksiüridin işaretleme indeksi, PCNA, Flow sitometri (FCM) gibi proliferatif indeks ölçen diğer yöntemlerle birlikte uygulanmış ve çalışmaların büyük bir kısmında aralarında belirgin korelasyon bulunmuştur (8-9).

Bu çalışmanın amacı, serviks kanserlerinin prekanseröz lezyonu olan servikal intraepitelyal neoplazilerde AgNOR değerini ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1988-1994 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen 40 adet histerektomi ve biyopsi materyeli çalışmaya alındı.

TABLO 1. OLGULARA AİT ORTALAMA AGNOR DEĞERLERİ

HİST. TANI	ORT. AgNOR DEĞ.
Kr. Ser.	2.94±0.53
CIN I	4.05±0.63
CIN II	6.10±0.36
CIN III	6.69±0.78

HİST TANI: Histoloji tanı; ORT. AgNOR DEĞ: Ortalama AgNOR değerleri; Kr. Ser: Kronik Servisit; CIN I: Servikal intraepitelyal neoplazi Grade I; CIN II: Servikal intraepitelyal neoplazi Grade II; CIN III: Servikal intraepitelyal neoplazi Grade III.

Tüm parafin bloklar ilk tanının doğrulanması ve displazi derecesinin tayin edilmesi amacıyla 3 mikron kalınlığında kesildi. Hematoksilen-Eozin ve PAS boyaları uygulanarak ışık mikroskopuyla tekrar değerlendirildi. Bütün incelemeler OLYMPUS BH-2 ışık mikroskobu ile yapıldı.

AGNOR YÖNTEMİ

AgNOR çalışma çözeltisi:

A) AgNO ₃	10g.
Bidistile su	20 ml.
B) Jelatin	0.2 gr.
Bidistile su	10 ml.
Derişik formik asit	0.1 ml.

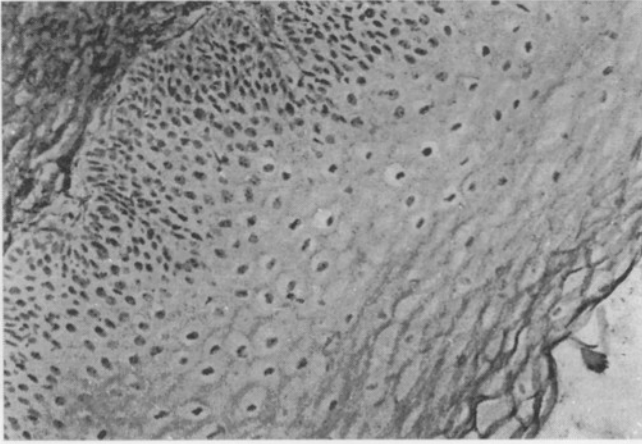
Gümüş nitrat çözeltisi süzülerek kullanıldı. Jelatin çözeltisinin hazırlanmasında jelatinin homojen olarak çözülmesini sağlamak amacıyla solüsyon ısıtıldı. Çalışma çözeltisi hazırlanırken A çözeltisinden 2 ölçü. B çözeltisinden 1 ölçü alınarak karıştırıldı.

* Bingöl Devlet Hastanesi Patoloji Uzmanı.

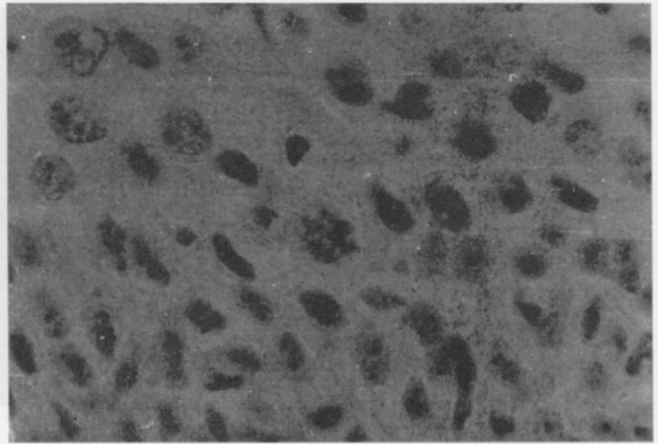
** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

*** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

**** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı.



Şekil 1. A: Kronik servisit ait x200 büyütmede AgNOR görüntüsü.



Şekil 1. B: x1000 büyütmede aynı olguya ait görüntü.

Boyama İşlemi

Kesitler üç ksilol solüsyonu ile azalan yoğunlukta üç alkol serilerinden geçirilerek suya getirildi. Deiyonize distile suda iyice çalkalanan kesitler etüvde kurutulduktan sonra A ve B çözeltilerinin karışımından elde edilen taze AgNOR çalışma çözeltisi kesit ve preparat yüzeyini örtecek şekilde damlatılarak uygulandı. Boyama karanlık ortamda 25-30 °C arasında gerçekleştirildi. Boyama süresi genel olarak 30 dakika idi, ancak 25 dakikadan sonra üzerindeki boya çözeltisi dökülmeksizin lamel ile kapatılan preparatın mikroskopik kontrol sonucuna göre boya süresi belirlendi. Boyama işlemi sonrası preparatlar deiyonize distile suda iyice yıkanıp % 5 Sodyum Tiyosülfat'tan geçirilerek artefaktların giderilmesine çalışıldı. Artan yoğunlukta alkol serilerinde rehidrate edilen preparatlar ksilolde temizlenip sentetik kapatma maddeleriyle kapatıldı.

Değerlendirme işlemi x1000 büyütme ile ışık mikroskopunda yapıldı. Her preparattan epitelin tüm tabakalarını içerecek şekilde 100 adet hücre nükleolusunda Crocker (10)'ın önerdiği sisteme göre sayım yapıldı. Sayım iş-

lemi sırasında nükleolus içinde ve dışında yer alan, seçilebilen AgNOR benekçiklerinin tümü tek tek sayıldı. Nükleus başına düşen AgNOR sayısı toplam sayının 100'e bölünmesiyle bulundu.

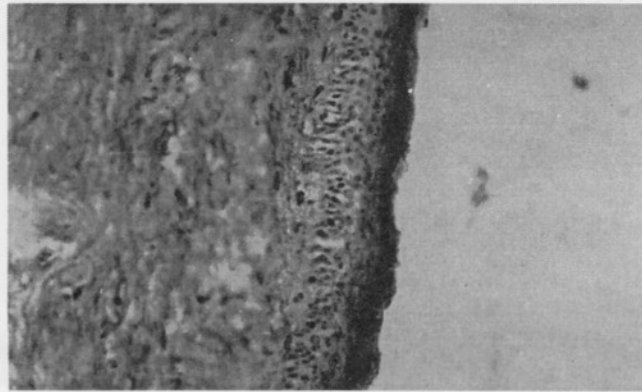
İstatistiksel değerlendirmede "t" testi kullanıldı.

BULGULAR

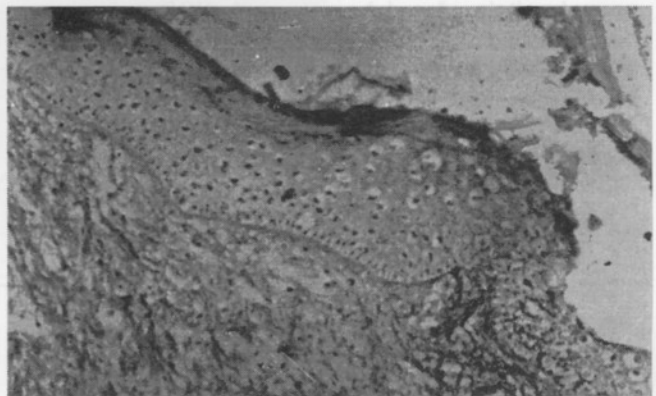
İncelenen 40 serviks örneğinde kronik servisit, CIN I, CIN II ve CIN III eşit sayıda olup her birinden 10 olgu çalışmaya alındı.

Proliferatif aktivitenin ortaya konulması için tüm olguların AgNOR değerlendirmeleri yapıldı. AgNOR yöntemi uygulanarak yapılan incelemede nükleolus içinde ve dışında, seçilebilen AgNOR benekçikleri gözlemlendi. Kronik servisit, CIN I, CIN II ve CIN III'ün AgNOR yöntemine ait histolojik görüntü sırasıyla şekil 1,2,3 ve 4'te gösterilmiştir.

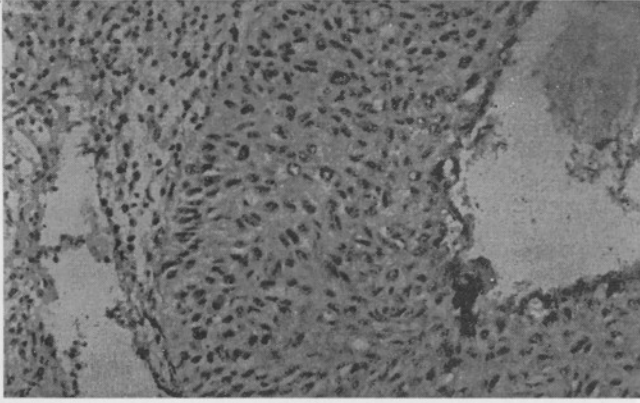
AgNOR yöntemine ait değerlendirme sonuçları, tablo 1'de görüldüğü gibi bulunmuştur. Displazi derecesinin artışıyla birlikte ortalama AgNOR değerlerinin de artış gösterdiği tespit edildi. Olguların ortalama AgNOR değerlerine ait serpinti grafiği şekil 5'de görüldüğü gibidir.



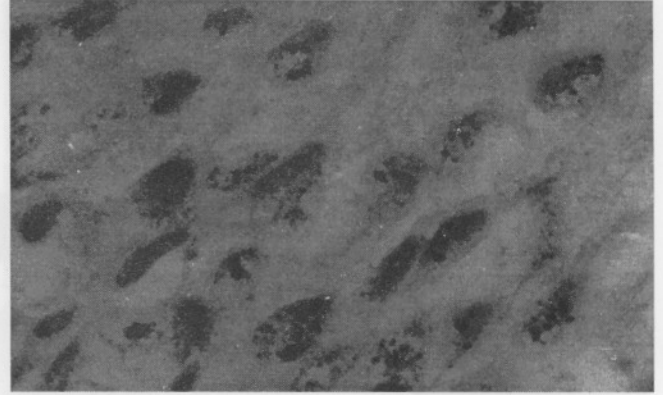
Şekil 2. CIN I'e ait x200 büyütmede AgNOR görüntüsü.



Şekil 3. CIN II'e ait x200 büyütmede AgNOR görüntüsü.



Şekil 4. A: CIN III'e ait x 200 büyütmede AgNOR görüntüsü.



Şekil 4. B: x1000 büyütmede aynı olguya ait görüntü.

AgNOR değerlendirilmesinde CIN I olgularının kronik servistten oldukça fazla AgNOR değerlerine sahip olduğu görüldü ($p<0.005$). CIN II ve CIN III olgularının ise, kronik serviste oranla ortalama AgNOR sayısının çok ileri düzeyde yüksek olduğu bulundu ($p<0.0001$). CIN I ve CIN II arasında da AgNOR değerleri çok farklı ($p<0.0001$) olduğu halde, CIN II ve CIN III arasındaki farkın daha az olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Kr. servisit ile servikal displazi olgularına ait AgNOR değerlerinin istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 2'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu hücrenin proliferatif aktivitesini göstermeye yöneliktir. Histokimyasal bir yöntem olan AgNOR da bu amaçla kullanılmaktadır.

Egan ve arkadaşları (11) normal bazal hücre ile CIN I, CIN II ve CIN III arasındaki ortalama AgNOR değerleri arasında belirgin fark olduğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmada da Egan'la uyumlu olarak, kronik servisit ile CIN I, CIN II ve CIN III arasında ortalama AgNOR değerlerinde belirgin farklılık olduğu, CIN II ve CIN III arasında ise istatistiksel olarak daha az olmasına karşın farkın yine anlamlı olduğu bulundu. Marbaix ve arkadaşları (12) da yaptıkları bir çalışmada, CIN III ve invaziv karsinomda normal epitele göre daha yüksek AgNOR değerleri bulduklarını bildirmişlerdir. Ancak Rowland (13)'ün servikal lezyonlardaki çalışmasında, diğer araştırmacılara zıt olarak normal serviks epitel ile CIN I ve CIN II lezyonların-

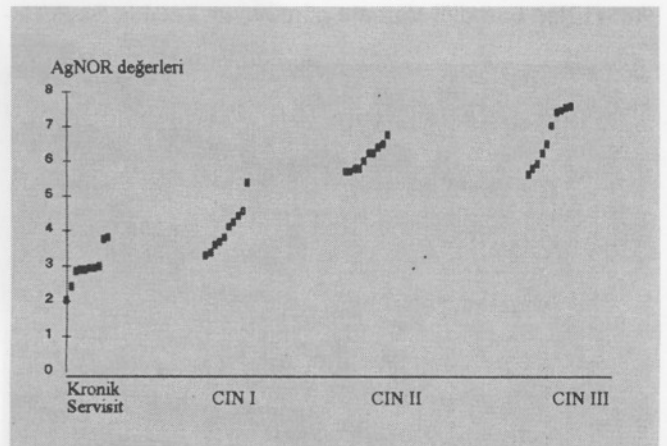
daki AgNOR değerleri arasında belirgin noktalanma farkı olmadığı bildirilmiştir. Leopardi ve arkadaşları (14), kondilom ve normal servikal doku ile CIN I, II ve III arasında anlamlı bir farklılık olduğunu, CIN II ve CIN III arasında ise fazla fark olmadığını belirtmişlerdir. Nitekim çalışmamızda da CIN II ve CIN III arasında fark olsa bile, CIN I ve CIN III arasındaki farka oranla oldukça düşük düzeyde olduğu gözlemlendi.

Egan ve arkadaşları (15) AgNOR'la ilgili diğer bir çalışmalarında, CIN lezyonlarında AgNOR büyüklükleri ve sayıları arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve displazi derecesi arttıkça AgNOR sayısının artışına karşın, AgNOR büyüklüklerinin azaldığını gözlemişlerdir. Çalışmamızda da servikal displazi derecesi arttıkça ortalama AgNOR değerlerinin yükseldiği bulundu. Ancak AgNOR büyüklüğüne ait bir değendirme amacımız dışında olduğundan yapılmadı.

AgNOR yöntemiyle diğer proliferasyon indeksleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sentez fazı belirleyicisi olarak bilinen bromodeoksiüridin antikorları kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda S faz fraksiyonu ile AgNOR arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (16).

TABLO 2. KRONİK SERVİSİT İLE SERVİKAL DİSPLAZİ OLGULARINA AİT AgNOR DEĞERLERİNİN İSTATİSTİKSEL KARŞILAŞTIRMA SONUÇLARI

KS-CIN I	($p<0.005$)
KS-CIN II	($p<0.0001$)
KS-CIN III	($p<0.0001$)
CIN I-CIN II	($p<0.0001$)
CIN I-CIN III	($p<0.0001$)
CIN II-CIN III	($p<0.05$)



Şekil 5. Olguların ortalama AgNOR değerlerine ait serpinti grafiği.

Thickett ve arkadaşları (17) tarafından yapılan bir çalışmada servikal intraepitelyal neoplazi ile HPV enfeksiyonlarında AgNOR ve flow sitometrik analiz ile S+G2'deki proliferatif aktivite araştırılmış, CIN II ve CIN III'te AgNOR sayısı ile % (S+G2) arasında orta derecede bir korelasyon gözlenirken CIN I, HPV, ve bazal hücre hiperplazisinde AgNOR sayıları ile % (S+G2) arasında ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, servikal displazi derecesinin artışıyla birlikte ortalama AgNOR değerleri artış göstermektedir. Kronik servisit, CIN I, CIN II ve CIN III olgularında AgNOR değerleri arasında giderek artan oranlarda fark olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Munoz N, Bosch FV, Jensen OM. Human papillomavirus and cervical cancer. Lyon: IARC Scientific Publication 1989;94:1-18.
2. Crocker J, Mocatney JC, Smith PJ. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-hodgkin's lymphomas. J Pathology 1988;154:151-156.
3. Crocker J, Egan MJ. Correlation between NOR sizes and numbers in non-hodgkin's lymphomas. J Pathology 1988;156:233-239.
4. Crocker J. Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE, ed. Current topics in pathology. Heidelberg: Springer 1990;91-149.
5. Hall PA, Crocker J, Watts A. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-hodgkin's lymphoma. Histopathology 1988;12:373-381.
6. Soomp IN, Whimster W. Growth fraction in lung tumours determined by Ki-67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. J Pathology 1990;162:217-222.
7. Tham KT, Page DC. AgNOR and Ki-67 in breast lesions. Am J Clin Pathol 1989;92:518-520.
8. Di Stefano D, Mingazzini PL, Scuchi L, Donetti M, Marinozzi VA. Comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. Cancer 1991;67:463-471.
9. Sakr WA, Sarkar FH, Sreepathi P, Drozdowicz S, Crissman JD. Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA and SPF. The Prostate 1993;22:147-154.
10. Crocker J, Boldy D, A.R., Egan MJ. How should we count AgNOR? Proposals for a standardized approach. J Pathology 1989;158:185-188.
11. Egan M, Freeth M, Crocker J. Intraepithelial neoplasia Human Papillomavirus infection and argyphilic nucleoprotein in cervical epithelium. Histopathology 1988;13:561-567.
12. Marbaix E, Dewandeleer S, Habba CL, Liegeors Ph, Willems T, Rahier J, Donnez J. Nucleolar organizer regions in the normal and carcinomatous epithelium of the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol 1989;8:237-245.
13. Rowlands DC. Nucleolar organising regions in cervical intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol 1988;41:1200-1202.
14. Leopardi O, Colavecchia A, Colecchia M, Dede A. Value of AgNOR counts in cervical pathology. Eur J Gynec Oncol 1992;539-544.
15. Egan M, Freeth M, Crocker J. Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervix and the size and number of nucleolar organizer regions. Gynecol Oncol 1990;36:30-33.
16. Tanaka T, Kateuchi T, Nishikawa A. Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. Jpn J Cancer Res 1989;80:1047-1051.
17. Thickett KM, Griffin NR, Griffiths Ap, Wells. A study of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia and Human Papillomavirus infection. Int J Gynecol Pathol 1989;8:331-339.