

OVERİN SERÖZ VE MUSİNÖZ EPİTELYAL TÜMÖRLERİNDE Ag-NOR YÖNTEMİ

Dr. Doğan Ö. (*) • Dr. İlhan R. (**) • Dr. Bulun S. (***)

ÖZET: Bu çalışmada 7'si kistadenom, 4'ü borderline kistadenom, 15'i kistadenokarsinom olmak üzere 26 epitelyal over tümörüne ait parafin blok kesitleri Ag-NOR yöntemi ile boyandı, Ag-NOR proteinlerinin sayı ve dağılımı incelendi. İki farklı sayım yöntemi uygulandı. Ortalama total Ag-NOR sayısı açısından kistadenom-borderline kistadenom-kistadenokarsinom arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kullanılan birinci sayım yönteminde borderline kistadenom ile kistadenokarsinom gruplarının dağılım sınırında karışma alanı mevcuttu. Buna karşılık diğer sayım yönteminde bu karışım izlenmedi, iki grup arasında kesin ayırım mümkün oldu. Bu sonuçlar Ag-NOR yönteminin overin epitelyal tümörlerinin değerlendirilmesinde yararlı bir yöntem olabileceğini düşündürdü.

ANAHTAR KELİMELEER: Over tumours, Ag-NOR, Nucleolar organizer regions.

SUMMARY: In this study, using the Ag-NOR staining technique Ag-NOR proteins have been studied in paraffin sections of 26 epithelial over tumours. These comprised 7 cystadenomas, 4 borderline cystadenomas, 15 cystadenocarcinomas. Two different counting methods were applied. Some statistically significant differences in mean Ag-NOR counts between cystadenomas-borderline cystadenomas and cystadenocarcinomas were noted. There were some overlapping results between borderline cystadenomas and cystadenocarcinomas on the first counting method. On the second counting method, one could differentiate between these two groups. We suggest that this simple histochemical technique maybe a useful supplement to histopathological examination of the epithelial ovarian tumours one could simple histochemical technique may be a useful supplement to histopathological examination of the epithelial ovarian tumours.

KEY WORDS: Over tumours, Ag-NOR, Nucleolar organizer regions.

GİRİŞ

Tümör patolojisinde gerçek bir neoplastik lezyonla abartılı bir proliferasyonun ayırılması; neoplastik lezyonun malignite derecesinin ve prognozunun belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla hücre kinetiği yöntemleri proliferatif aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılmaya başlamıştır. Proliferatif aktivitenin değerlendirilmesinde basit ve ekonomik bir yöntem olan Ag-NOR¹ yöntemi son yıllarda önem kazanmıştır. Ag-NOR yöntemi; rDNA² segmentlerinde bulunan bazı nükleolar asidik fosfoproteinlerin gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopunda incelenmesini sağlar. Ag-NOR proteinleri adını alan bu proteinler rRNA³ sentezinde ve nükleolus organizasyonunda rol oynarlar. Bu nedenle ışık ve elektron mikroskopunda siyah benekler halinde gözlenen Ag-NOR proteinlerinin sayı ve dağılım özellikleri hücrenin proliferatif ve metabolik aktivitesini yansıtmaktadır. Bu temel özelliğe dayanılarak pekçok selim ve habis tümöral lezyon Ag-NOR yöntemi kullanılarak incelenmektedir.

Bu çalışmada seröz ve müsinöz olmak üzere 7'si selim, 4'ü borderline, 15'i habis toplam 26 epitelyal over tümörü Ag-NOR yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

NY, Buffalo State Univ. Hospital Patoloji biriminde 1988-91 yılları arasında incelenen 26 adet epitelyal over tümörü materyalimizi oluşturdu. Olguların % 10'luk formaldehitte tesbit edilmiş biopsi materyallerinden elde edilen parafin blok kesitleri Hematoksilin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. 3 olgu seröz, 4 olgu müsinöz kistade-

nom; 3 olgu seröz, 1 olgu müsinöz borderline kistadenom; 13 olgu seröz 2 olgu müsinöz kistadenokarsinom olarak yorumlandı. Borderline tümörlerde hücre sıralanmasının artması ve stromal invazyonun olmaması esas olarak alındı. Olgulara ait 3µm kalınlıktaki parafin blok kesitleri Ag-NOR yöntemi ile boyandı. Boyama işlemi önceki çalışmada belirtilmiştir (3). Kısaca; suya getirilen kesitler 35-45 dakika süre ile karanlık ortamda, oda ısısında, Ag-NOR çalışma eriyiğinde bekletilerek boyandı. Ag-NOR çalışma solüsyonu 2 birim % 50'lik AgNO₃ ile 1 birim asidik jelatin eriyiği karıştırılarak hazırlandı ve bekletilmeksizin kullanıldı. Asidik jelatin eriyiği % 2 oranında jelatin içeren % 1'lik formik asit eriyiğinden oluşmaktaydı. Boyama süresi boyama işlemi sırasında yapılan mikroskopik kontrol sonuçlarına göre belirlendi. Internal kontrol Ag-NOR'larının (lenfosit ve endotel hücre Ag-NOR'larının) yeterince boyanması, intranükleolar Ag-NOR'ların seçilmesi boyama işlemi sonlandırılacak kriterler olarak kullanıldı. Değerlendirme işlemi ışık mikroskopunda x1000 ve zaman zaman x2000 büyütme kullanılarak yapıldı. Her olguda hücreden en zengin alanlarda olmak üzere 100'er hücre değerlendirildi. Nükleus içinde küçük, siyah-kahverengi benekler olarak görülen Ag-NOR'ların tümü sayılarak nükleus başına düşen ortalama total Ag-NOR sayıları saptandı. Ayrıca ikinci bir değerlendirme yöntemi olarak extranükleolar Ag-NOR'lar ve nükleolus benzeri yapılar sayıldı (Prenükleolar cisimcikler ve nükleolar cisimler). Total Ag-NOR sayım yöntemindeki aksine burada nükleolus benzeri yapılar (nükleolar cisimler) tek Ag-NOR beneci olarak sayıldı. Bu yapılar içinde yer alan daha küçük Ag-NOR benekcikleri sayılmadı. Tümör grupları arasında izlenen ortalama Ag-NOR farklılıkları student t testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirildi.

SONUÇLAR

Ag-NOR proteinleri, tüm olgularda nükleus içinde siyah-kahverengi benekler halinde izlendi. Bazı Ag-NOR benekcikleri oldukça küçük boyutlu olup tek tek, birbirinden bağımsız olarak nükleus içinde yer almıştı (Prenükleolar cisimcikler). Bazı Ag-NOR benekcikleri ise bir araya gelerek nuk-

* Dr. Öner Doğan, İst. Tıp Fak. Patoloji ABD İstanbul.

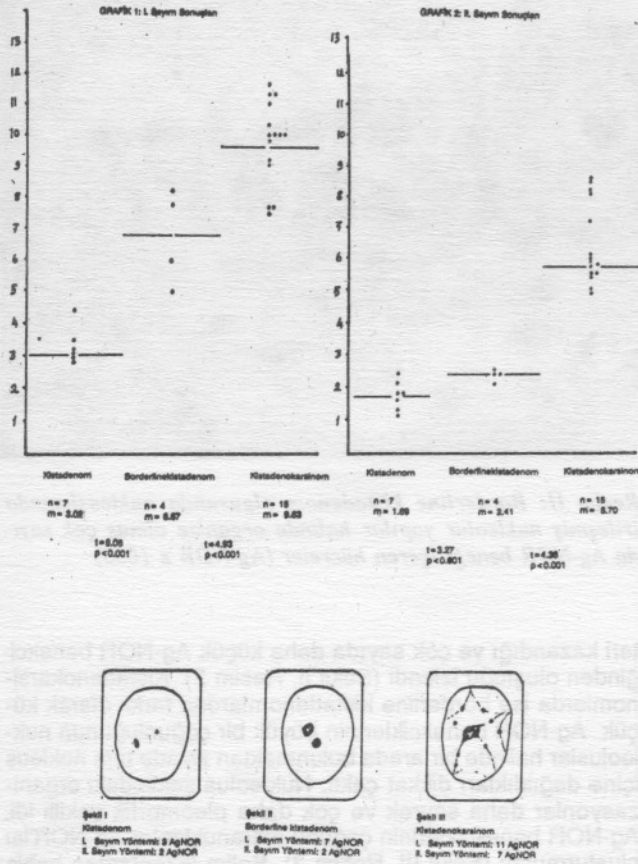
** Dr. Rıdvan İlhan, İst. Tıp Fak. Patoloji ABD İstanbul.

*** Dr. Serdar Bulun, Buffalo State Hosp. Jinekoloji Birimi New York.

1- Argyrophilic nucleolar organizer region.

2- Ribozomal deoxyribonucleic acid

3- Ribozomal ribonucleic acid



leolus benzeri daha iri yapılar (nukleolar cisimler) oluşturmaktaydı. Tüm Ag-NOR benekciklerinin yani prönukeolar cisimcikler halindeki Ag-NOR'lar ile nukleolar cisim içinde yer almış Ag-NOR'ların tek tek sayılması ile elde edilen ortalama total Ag-NOR değerleri ve dağılım sınırları gruplara göre şu şekilde belirlendi.

Kist adenomlar	3.02 (1.30 - 4.38)
Borderline kistadenomlar:	6.67 (4.9 - 8.16)
Kistadenokarsinomlar:	9.63 (7.44 - 11.62)

Kist adenom-borderline kistadenom, borderline kistadenom-kistadenokarsinom grupları arasındaki total Ag-NOR farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Sırası ile: $t=5.06$, $p<0.001$; $t=4.93$, $p<0.001$). Olgular tek tek ele alındığında kistadenom ve borderline kistadenom grupları arasında karışma yoktu. Buna karşılık borderline kistadenom ve kistadenokarsinom grupları arasında 5 olguyu kapsayan bir karışma bölgesi mevcuttu (Grafik 1). Bu özellik borderline kistadenom ve kistadenokarsinom ayırımında Ag-NOR yönteminin değerini kısmen de olsa azaltmaktaydı. Bu sakıncayı ortadan kaldırmak amacıyla gereç-yöntem bölümünde belirtilen ikinci sayım yöntemi kullanıldı. Ortalama Ag-NOR değerleri ve dağılım sınırları gruplara göre şu şekilde belirlendi.

Kist adenomlar	1.69 (1.1 - 2.43)
Borderline kistadenomlar:	2.41 (2.08-2.52)
Kistadenokarsinomlar:	5.70 (4.88-8.56)

Kistadenom-borderline kistadenom, borderline kistadenom-kistadenokarsinom grupları arasındaki ortalama Ag-NOR farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırası ile: $t=3.27$, $p<0.01$; $t=4.36$, $p<0.001$). Bu sistemde bir öncekinden farklı olarak borderline kistadenom ve kistadenokarsinom arasında kesin bir ayırım sağlandı. Buna karşılık kistadenom ve borderline kistadenom grupları arasında bir karışım ortaya çıktı. I ve II numaralı sayım yöntemleri Şekil I, II, III'de, sonuçlar Grafik 1 ve Grafik 2'de özetlenmiştir.

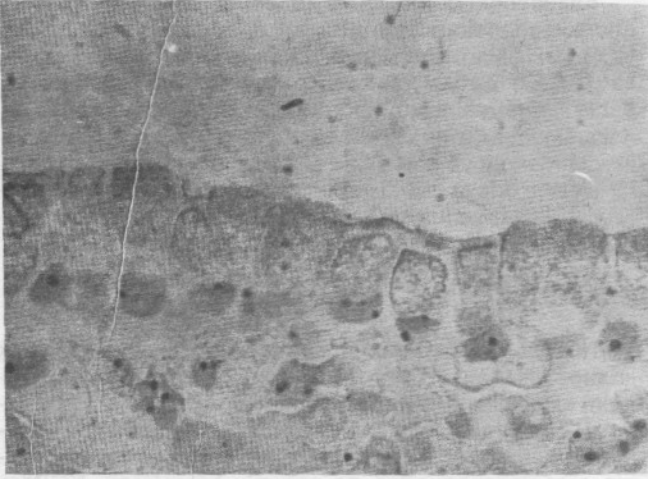
TARTIŞMA

NOR'lar (Nucleolar organizer regions), insan akrosentrik kromozomlarının (13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozomların) kısa kolları üzerinde bulunan gen bölgeleridir. Bu bölgeler rRNA'nın sentezini sağlayan rDNA segmentlerini içerirler. Bu nedenle NOR'lar ribozom üretimi ve protein sentezinin organizasyonundan da sorumlu bölgelerdir. NOR'lar üzerinde bulunan bazı asidik fosfoproteinlere "NOR"la ilişkili proteinler" adı verilir. Bu proteinler, gümüş iyonlarını bağlama özellikleri nedeniyle Ag-NOR proteinleri olarak da adlandırılırlar. Ag-NOR proteinlerinin ışık ve elektronmikroskopik düzeyde incelenmelerini sağlayan gümüşleme yöntemlerine de Ag-NOR yöntemleri denilmektedir. Genetikçiler uzun yıllardan beri kromozom yaymalarında gümüşleme yöntemlerini kullanarak NOR içeren kromozomları incelemişlerdir (4,6). Yöntemin bugünkü basitleştirilmiş şekli ile parafin blok kesitlerine uygulanarak patoloji alanına girmesi ilk defa 1986'da Ploton ve ark (9)'nın çalışması ile gerçekleşmiştir. Crocker ve ark. (1)'nin 1987'de başlattığı çalışmaları takiben Ag-NOR yöntemi ile selim ve habis lezyonların ayırımı konu alan pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışmaların çoğu Ag-NOR yönteminin değerli bir proliferasyon indexi olabileceği sonucuna varmaktadır. Ancak bugün için hücreler arasındaki Ag-NOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedeni ve Ag-NOR yönteminin standardizasyonu ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. NOR, Ag-NOR proteinleri, yapısal ve işlevsel özellikleri, hücre siklus ve hücre tipine göre gösterdikleri değişiklikler, Ag-NOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedenleri, Ag-NOR yöntemi ve uygulamaları ile ilgili çalışmalar ayrıntılı olarak ele alınıp tartışılmıştır (2,3).

Epitelial over tümörlerinin malignite derecelerinin belirlenmesi zaman zaman sorun olmaya devam etmektedir. Bu konuda Ag-NOR yönteminin değerini araştıran az miktarda çalışma vardır (5,7,8,10). Müsinöz tümörleri inceleyen Mauri ve ark. (8) kistadenom-borderline kistadenom - kistadenokarsinom grupları arasında ortalama total Ag-NOR değeri açısından anlamlı fark bulmuşlar, grup dağılım sınırları arasında karışma olmadığını bildirmişlerdir. Griffiths ve ark. (5) ise yöntemin seröz borderline kistadenom ve seröz kistadenokarsinom ayırımında değerli olduğunu, müsinöz tümörlerin ayırımında yarar sağlamayacağını belirtmişlerdir.

Ancak bu çalışmada boyama süresi 60 dakika olarak uygulanmıştır. Boyama süresinin bu kadar uzun tutulması intranukleolar Ag-NOR sayımını olanaksız hale getirecektir (3). Kinsey ve ark. (7) müsinöz tümörlerde yaptıkları çalışmada tümör gruplarının birbirinden ayırtılabileceğini bildirmişlerdir. Prasad ve ark. (10) gruplar arasında anlamlı farklılıklar bildirmiş, yöntemin ayırtıcı tanıda yararlı olabileceğini vurgulamıştır. Ancak gruplar arasındaki Ag-NOR dağılım sınırlarında az da olsa bir karışım izlenmiştir.

Çalışmamızda overin kistadenom, borderline kistadenom ve kistadenokarsinomları arasında ortalama total Ag-NOR sayısı açısından anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. An-



Resim I: Kistadenom olgusunda nükleusların 1-2 adet Ag-NOR benekli içeren hücreler (Ag-NOR x 1000)

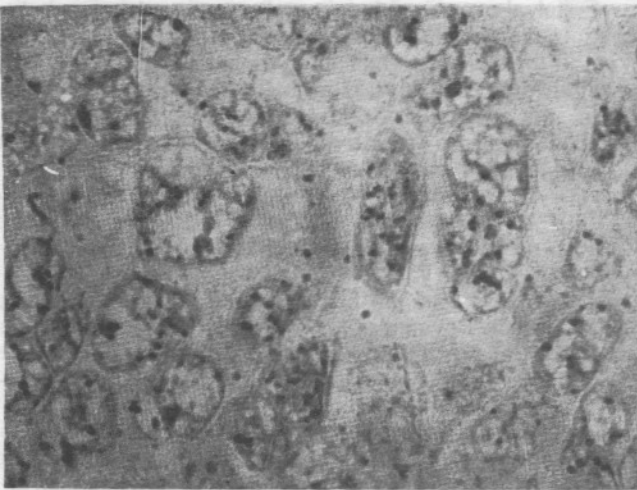


Resim II: Borderline kistadenom olgusunda nükleuslarında irileşmiş nukleolar yapılar halinde organize olmuş çok sayıda Ag-NOR benekli içeren hücreler (Ag-NOR x 1000)

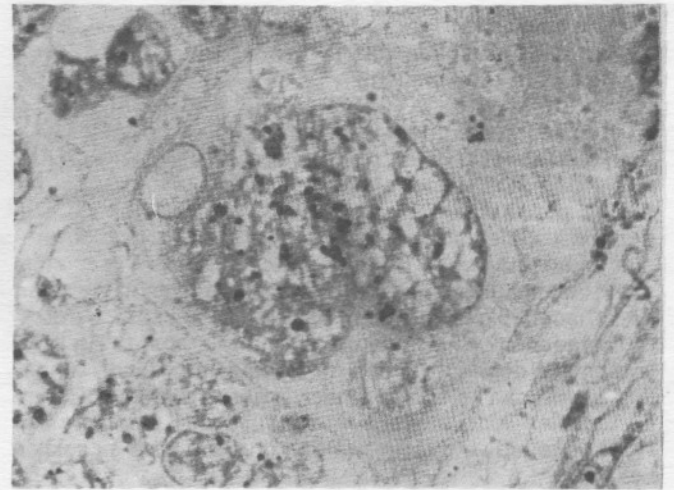
cak, bonderline kistadenom ve kistadenokarsinom grupları arasındaki Ag-NOR dağılım sınırında ortak olgulara rastlanmıştır. Bu nedenle ortalama total Ag-NOR sayısı bu iki tümör grubunun ayırımında yararlı olmakla beraber her zaman yeterli olmayacaktır. Buna karşılık uygulanan II. değerlendirme yönteminde bu yetersizlik ortadan kalkmakta tam ayırma gidilebilmektedir.

Çalışmamızda Ag-NOR sayı farklılıkları dışında Ag-NOR dağılım farklılıkları da dikkat çekiciydi. Kistadenomlarda tek veya az sayıda, genellikle küçük veya orta büyüklükte Ag-NOR benekleri izlendi. Ancak seyrek olarak bazı hücrelerde bu beneklerin büyüdüğü, nukleolus benzeri yapı kazandığı, çok sayıda daha küçük Ag-NOR beneciğinden oluştuğu gözlemlendi (Şekil I, Resim 1). Borderline kistadenomlarda hemen tüm Ag-NOR beneklerinin büyüdüğü, nukleolus karak-

teri kazandığı ve çok sayıda daha küçük Ag-NOR beneciğinden oluştuğu izlendi (Şekil II, Resim 2). Kistadenokarsinomlarda ise borderline kistadenomlardan farklı olarak küçük Ag-NOR benekciklerinin büyük bir çoğunluğunun nukleoluslar halinde bir arada bulunmaktan ziyade tüm nukleus içine dağıldıkları dikkat çekti. Nukleolus şeklindeki organizasyonlar daha seyrek ve çok daha pleomorfik şekilli idi. Ag-NOR benekciklerinin çoğunu extranukleolar Ag-NOR'lar oluşturmuştu (Şekil III, Resim 3). Selim lezonlardan habis lezyona doğru gidildikçe önce Ag-NOR benekleri irileşmekte, nukleolus benzeri görünüm kazanmakta, bu yapılar içinde daha küçük boyutlu çok sayıda Ag-NOR beneciği belirlemekteydi. Malignite derecesi arttıkça nukleolus benzeri yapılar daha da büyüüp düzensizleşmekte ve en sonunda



Resim III: Kistadenokarsinom olgusunda tüm nükleus içine dağılmış çok sayıda Ag-NOR benekli içeren hücreler (Ag-NOR x 1000)



Resim IV: Kistadenokarsinom olgusunda tüm nükleus içine dağılmış çok sayıda Ag-NOR benekli içeren hücre (Ag-NOR x 1250)

büyük ölçüde ortadan kalkarak yerini tüm nükleus içine dağılmış çok sayıda küçük boyutlu Ag-NOR benekciklerine bırakmaktaydı (Şekil I-II-III).

Sonuç olarak Ag-NOR yöntemi overin epitelial tümörlerinin malignite derecesini belirlemede yararlı bir yöntemdir. Değerlendirmede sadece ortalama total Ag-NOR sayısı değil Ag-NOR dağılım özellikleri de gözönünde bulundurulmalıdır. Özellikle borderline kistadenom - kistadenokarsinom ayırımında ortalama total Ag-NOR sayısından çok Ag-NOR'ların nükleolus halinde organize olup olmadıkları önem kazanmaktadır. Daha kesin sonuçlara ulaşmak için çok sayıda olgunun klinik izlem verileri ile birlikte değerlendirildiği ayrıntılı, standart çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Crocker J., Nar P.: Nucleolar organizer regions in lymphoma, J. Pathology 151: 111-118, 1987.
2. Crocker J.: Nucleolar organiser regions. In: Underwood JCE. ed. Current Topics in Pathology. Heidelberg: Springer, 1990: 91-149 (155 kaynak bildirimli).
3. Doğan Ö.: Nöroblastom-Ganglionöroblastom-Ganglionörom tümör serisinde Ag-NOR yöntemi, uzmanlık tezi, İstanbul Tıp Fakültesi Tez bürosu, İstanbul, 1991 (237 kaynak bildirimli).
4. Goodpasture C., Bloom SE: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53: 37-50, 1975.
5. Griffiths AP, Pickles A., Wells M.: Ag-NOR in diagnosis of serous and mucinous ovarian tumours. J. Clin. Pathology, 42: 1311, 1989.
6. Howell WM, Denton TE, Diamond JR: Differential staining of satellite regions of human acrocentric chromosomes. Experientia 31: 260-261. 1975.
7. Kinsey W., Brown LJR.: Nucleolar organizer regions in mucinous tumours of the ovary. Histopathology 17: 481, 1990.
8. Mauri FA., Barbareschi M., Scampini S., et al: Nucleolar organizer regions in mucinous tumours of the ovary. Histopathology 16: 396-397, 1990.
9. Ploton D., Menager M., Jeannesson P., et al: Improvement in staining and in the visualization of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at optical levels. Histochemical Journal 18: 5-14, 1986.
10. Prasad C., Ray J.: Significance of nucleolar organizing regions in epithelial tumors. Lab. Invest. 64: 1, 60A, 1991.