

Ag-NOR SAYI VE DAĞILIM FARKLILIKLARININ NEDENLERİ

Dr. Doğan Ö. (*)

ÖZET: Bu derlemede hücreler arası Ag-NOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedenleri tartışıldı.

ANAHTAR KELİMELEER: Ag-NOR, nucleolar organizer regions.

SUMMARY: In this review the causes of differences in Ag-NOR counting and Ag-NOR dissociation between the cells were discussed.

KEY WORDS: Ag-NOR, nucleolar organizer regions.

GİRİŞ

Ag-NOR¹ yöntemi; rRNA² sentezine kaynaklık eden rDNA³ segmentlerinde yer alan, non histon yapısındaki bazı "nukleolar asidik fosfoproteinler"⁴in günüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskobunda incelenmesini sağlar.

Ag-NOR yöntemi, Ag-NOR proteinlerinin siyah benekcikler halinde boyanarak incelenmesini sağlar. Ag-NOR benekcikleri veya kısaca "Ag-NOR" olarak bilinen bu yapıların sayı ve dağılımı Ag-NOR proteinlerinin dolayısıyla da rDNA gen segmentlerinin yapısal ve işlevsel özelliklerini yansıtır. Bu temel özellikten hareket edilerek metabolik ve proliferatif aktivite farklılıkları gösteren normal, selim ve habis tümöral hücreler arasında Ag-NOR sayı ve dağılımının da farklı olduğu ileri sürülmektedir. Son yıllarda bu görüş doğrultusunda yapılan pek çok çalışma Ag-NOR yönteminin diagnostik ve prognostik açıdan tümöral lezyonların değerlendirilmesinde oldukça yararlı bir çoğalma belirteci (proliferasyon indeksi) olabileceğini ortaya koymaktadır. Bugün için tümör patolojisi ve hücre kinetiği alanında uygulama şansı bulmaya başlayan Ag-NOR yönteminin hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden hangilerini ne ölçüde ve nasıl yansıttığı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle normal, selim ve habis tümöral hücreler arasında gözlenen Ag-NOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedeni konusunda tartışmalar devam etmektedir (7,8,9,11,16,17,21,22,27,32,35,48,49,54,60,62,66,60,71). Ag-NOR farklılıklarını açıklamak amacıyla ileri sürülen başlıca görüşler şunlardır:

1- Hiperploidi: rDNA segmentlerini içeren kromozomlarda sayıca artış söz konusudur.

2- rDNA'nın transkriptif aktivitesinde değişiklik: Protein ihtiyacını karşılamak üzere aktif rDNA sayısında artış söz konusudur.

3- Nukleolar ayrışma ve/veya nukleolar birleşme bozukluğu: Hücrede proliferatif aktivite yüksektir. Buna bağlı olarak rDNA'lar ve nukleoluslar büyük ölçüde ve sürekli olarak ayrılmış halde bulunurlar. Veya hücre siklusundan bağımsız olarak rDNA ve nukleoluslarda genel bir birleşme bozukluğu vardır.

4- Gen çoğalımı (amplifikasyonu): rDNA bölgelerini içeren DNA segmentlerinde çoğalım söz konusudur.

5- Hüresel farklılaşma derecesi

1- Hiperploidi

rDNA'ların ve Ag-NOR proteinlerinin akrosentrik kromozomlar üzerinde bulunması nedeniyle Ag-NOR yönteminin ploidi durumunu yansıtabileceği düşünülmüştür (6,27,53,69). Flow sitometri ile yapılan bazı çalışmalarda, DNA ploidi-si ile Ag-NOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (31,43). Buna karşılık yine flow sitometri ile yapılan pek çok çalışmada ise Ag-NOR sayısı ile ploidi arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (7,26,27,41,53). Derenzini ve ark. (17), gerçek kromozomal değerlendirme yapmak amacıyla tümör hücre kültürlerinin karyotipik incelemelerini yaptı. Bu çalışmada çoğalma hızları ve interfazik Ag-NOR değerleri birbirinden çok farklı iki nöroblastom hücre kültürü incelendi. Bu iki farklı tümör kültürü arasında kromozom sayısı ve metafazik Ag-NOR değerleri açısından farklılık gözlenmedi. Metafazda Ag-NOR proteinlerinin büyük ölçüde kaybolduğu göz önüne alınarak ve rRNA problemleri kullanılarak gerçek metafazik NOR sayıları incelendi. İki tümör tipi arasında belirgin fark gözlenmedi. Bu iki nöroblastom klonu arasındaki interfazik Ag-NOR farklılığının ploidiye bağlı olmadığı; interfazik Ag-NOR farklılığının metafazik Ag-NOR değerlerine yansımadağı belirtildi.

Jan-Mohamed ve ark. (35), yüksek ve düşük gradlı lenfomalarda yaptığı benzer çalışmada, interfazda gözlenen Ag-NOR farklılığının metafazda saptanmadığını, interfazik Ag-NOR farklılıklarının ploidi ile açıklanamayacağını belirtti. Aynı düşünceler diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (14,61). Bazı lösemi ve solid tümörlerde yapılan çalışmalarda da normal ve tümöral hücre metafazları arasında Ag-NOR farklılıkları gözlenmemiştir (56,68). Delozier ve ark. (14), testis tümörlerinde yaptığı çalışmada metafaz kromozom yaymalarında D ve G grubu kromozomlar dışında anormal yerleşimli Ag-NOR'ların bulunduğu bildirilmiştir. Ancak Jan-Mohamed ve ark. (36) lenfomalarda yaptığı çalışmada interfazik Ag-NOR farklılıklarının anormal lokalize Ag-NOR'lerden kaynaklanmadığını belirtmiştir.

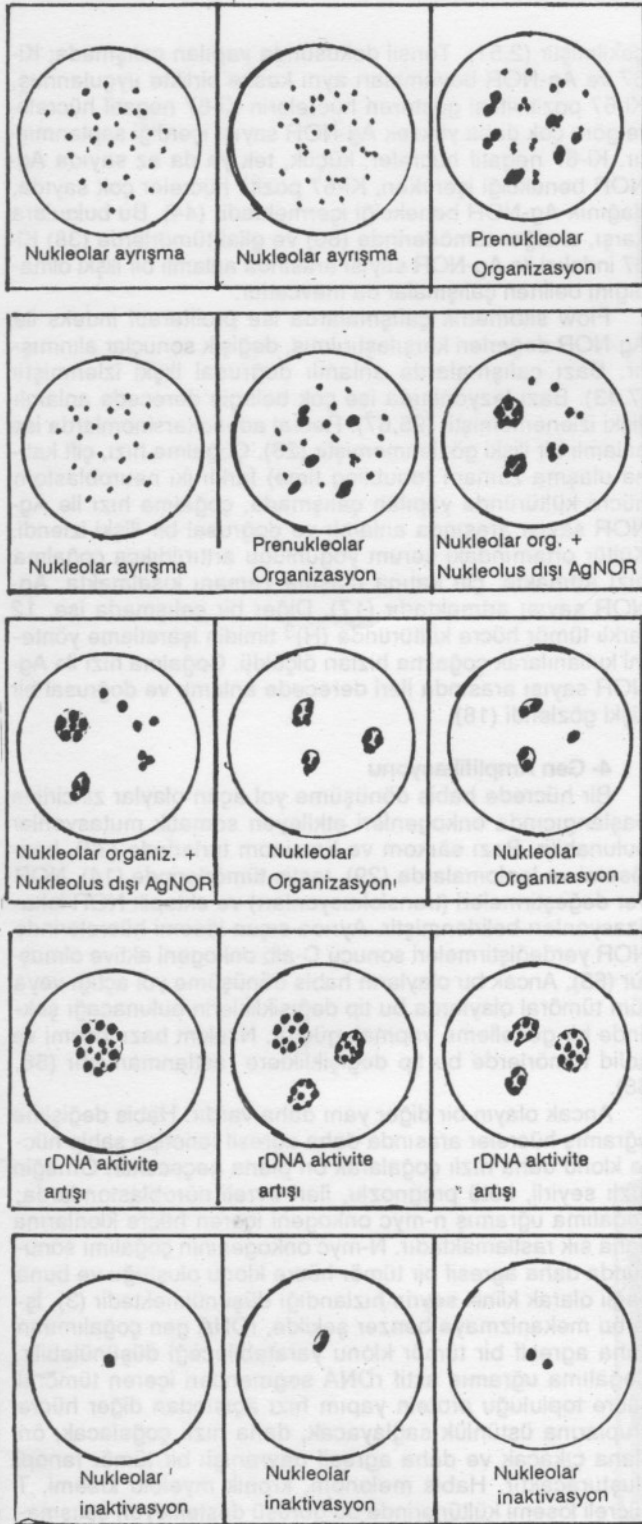
Ag-NOR artışının, sentez fazında rDNA'nın duplikasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülebilir. Nitekim, sentez (S) fazı belirleyicisi olarak bilinen Bromodeoxuridin (Brd-Urd) antikorları kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda S faz fraksiyonu ile Ag-NOR sayısı arasında doğrusal, anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (37,38,46,65). Ancak, bilindiği gibi S fazı hücre siklusunun çok küçük bir dilimini oluşturmaktadır (27). Bu nedenle, hücrelerin çoğunun S fazında bulunarak Ag-NOR ortalamasını yükselttiğini söylemek güçtür. Nitekim glial tümörlerde Brd-Urd indeksi ile Ag-NOR skoru arasında ilişki kurulamamıştır (38). Ayrıca, DNA duplikasyonu için uyarılmış hücrelerde interfazik Ag-NOR sayısındaki artışın sentez fazının başlamasından önce gerçekleştiği bildirilmiştir (15).

* Dr. Öner Doğan; İst. Tıp Fakültesi, Patoloji ABD, İstanbul
1-Arkyrophil nucleolar organizer region.

2-Ribozomal RNA

3-Ribozomal DNA

4-Ag-NOR proteinleri



Suresh ve ark. (62), değişik plasental trofoblastik hücrelerde yaptığı çalışmalarda, Ag-NOR farklılığının ploidi ile ilişkili olduğunu, proliferatif aktivite ile ilişkili olmadığını ileri sürmüştür. Ancak Ag-NOR değerlendirmelerinin yapıldığı dokularda karyotipik çalışma uygulanmamış, çoğalma hızı belirlenmemiş; Ag-NOR değerleri teorik bilgiler ışığında yorumlanmıştır.

- 1- Yüksek düzeyde proliferatif aktivite (Nöroblastom)
 - Toplam AgNOR sayısı çok yüksek
 - Belirgin nukleolar organizasyon yok
 - RNA sentezi belirgin değil

- 2- Orta derecede proliferatif aktivite (Ganglionöroblastom)
 - Toplam AgNOR sayısı yüksek
 - Yer yer nukleolar organizasyon var
 - Yer yer RNA sentezi belirgin

- 3- Düşük düzeyde proliferatif aktivite (Ganglionörom)
 - Toplam AgNOR sayısı azalmış. Nukleolus içi AgNOR'lar ön planda. Yer yer nukleolus dışı AgNOR'lar var.
 - Nukleolar organizasyon belirgin
 - RNA sentezi belirgin

- 4- Yüksek düzeyde metabolik aktivite (Hipofiz adenomu, barsak ganglion hüç.)
 - Toplam AgNOR'ların hemen tamamı nukleolus içi.
 - Nukleolar organizasyon belirgin
 - RNA sentezi belirgin

- 5- Düşük düzeyde metabolik ve proliferatif aktivite (olgun lenfosit, schwann hücreleri)
 - Toplam AgNOR sayısı en az düzeyde
 - Belli-belirsiz küçük nukleolus
 - Belirgin, aktif bir RNA sentezi yok

Sonuç olarak bugün, karyotipik çalışmalar ve özellikle flow sitometrik çalışmalar, hücreler arası Ag-NOR farklılıklarının hücresel ploidi farklılıklarından kaynaklanmadığı görüşünün genel olarak kabul görülmesini sağlamıştır.

2- rDNA'nın Transkriptif Aktivitesinde Artış

Ag-NOR sayı ve boyanma yoğunluğunun aktif transkripsiyon yapan rDNA'ların sayısına bağlı olarak değiştiği ileri sürülmektedir. Bu görüşe göre, rRNA transkripsiyon kompleksinin fonksiyonel olarak aktif olması gümüşle boyanmayı sağlamaktadır. Hücreler arasındaki Ag-NOR farklılıklarının temelinde hücreler arasındaki rDNA aktivite düzeyindeki farklılıkların bulunabileceği ileri sürülmektedir (1,23,25,30,34,54, 60,66,69,70).

Bu görüşün ortaya çıkmasına neden olan başlıca çalışmalar şunlardır. İnsan-fare hücre hibridlerinde, Ag-NOR boyanması ile rRNA sentezi arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir (5,39). Blastik transformasyon gösteren lenfositlerde gözlenen Ag-NOR artışı, rDNA aktivasyonuna bağlanmıştır (13, 40). Fibroblast kültürlerinde, rRNA sentezini uyaran büyüme hormonu ve deksametazonun ortama katılması ile Ag-NOR sayısında artış görülmüştür (11,12). Adrenalektomi uygulanan sıçanlarda hipofizdeki morfolojik büyüme 2. haftada sona ermektedir. Buna karşılık Ag-NOR sayısındaki artış hormon sentezi ile ilişkili olarak 2. haftadan sonra da devam etmiştir (47). Farklı rRNA sentez hızlarına sahip insan hücre kültürlerinde rDNA aktivitesi ile Ag-NOR boyanması arasında doğrusal ilişki gözlenmiştir (58). İnsan diploid fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmada Ag-NOR boyanması ile rRNA sentezinde kullanılan $(H)^3$ işaretili uridin miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (42). Yaş arttıkça, lenfosit meta-fazlarında rDNA'ların giderek inaktif hale gelmesi ve kaybı ile birlikte Ag-NOR sayısında azalma izlenmiştir (10). Ancak bu çalışmaların hemen tümünde gerçek tümöral olaylar incelenmemiş, yapım faaliyeti artmış normal ve hiperplazik hücreler değerlendirilmiştir. Buna karşı Derenzini ve ark. (17); çoğalma hızı, interfazik Ag-NOR sayıları farklı iki ayrı

neuroblastom hücre kültüründe rRNA düzeyleri arasında bir farklılık gözlemlenmiştir. Kortizol ve parsiyel hepatektomi yapılarak uyarılmış hepatositlerde rDNA aktiviteleri arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Buna karşı S fazı başlamadan önce rezeksiyon yapılarak proliferasyona zorlanan hepatositlerdeki Ag-NOR sayısının kortizol ile uyarılan hepatositlerden iki kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (Pession A.'nın yayınlanmamış çalışması. 17'den naklen). Ag-NOR sonuçlarından direk olarak sadece rDNA aktivite düzeyinin sorumlu olmayacağını savunan diğer araştırmalar şunlardır. Aktinomisin-D, D-Galaktozamid, adriamisin gibi rRNA sentezini bloke eden maddeler kullanılarak yapılan çalışmalarda rRNA sentezinin bloke edildiği durumlarda bile Ag-NOR aktivitesinin tamamen ortadan kalkmadığı görülmüştür (20,30,34,55). rRNA sentezinin doğal olarak durduğu metafazda bile kromozomlar üzerinde Ag-NOR boyanması gözlenmektedir (23,49, 57). rRNA sentezinin olmadığı bilinen olgun oosit ve tek hücreli embriyoda elektronmikroskopik olarak Ag-NOR boyanması izlenmiştir (64). Adriamisin ile tedavi edilen tükrük bezi adenomunda Ag-NOR artışı kontrol altına alınamamıştır (45).

3- Nukleolar Ayrışma. Nukleolar Birleşme Bozukluğu

Daha önce de belirtildiği gibi nukleolus organizasyonu hücrenin bulunduğu siklus fazına bağlı olarak değişmektedir (50). rDNA'ları taşıyan kromozomların hareketlerine bağlı olarak profaz ile birlikte nukleolusda ayrışma, parçalanma başlar tüm mitoz boyunca kromozomal dağılma devam eder, rRNA sentezi durur. Bu nedenle nukleolus organizasyonu görülmez (Nukleolar ayrışma). Geç telofaz ve erken Gap 1 (G₁) dönemlerinde rDNA segmentleri ve yeniden ortaya çıkan Ag-NOR proteinleri birbirleriyle birleşir. Bunu takiben rRNA sentezi yeniden başlar. Prenukleolar cisimcikler ve daha sonra da nukleolar oluşur (nukleolar birleşme).

Hızlı çoğalan, yüksek gradlı tümörlerde nukleolar birleşmenin henüz tamamlanmadığı erken G₁ ve mitoz fazlarında bulunan hücre oranı yüksektir. Buna karşı normal dokuda veya düşük gradlı tümörlerde ise nukleolar birleşmenin sağlandığı G₁ ve G₀ dönemlerinde bulunan hücre oranının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (35). Bu görüş doğrultusunda Ag-NOR farklılıklarının hücre çoğalma hızına ve incelenen hücre topluluğunun hücre siklus faz dağılımına bağlı olarak geliştiği düşünülebilir (35). Nukleolar birleşmenin tam olarak sağlandığı G₀ döneminde; hücrenin metabolik faaliyetine bağlı olarak değişik büyüklükte tek veya az sayıda nukleolus izlenir. Bu nukleoluslar içinde, birbiri ile birleşme eğilimi gösteren, sayıları hücrenin metabolik faaliyetine göre değişebilen Ag-NOR benekcikleri bulunur. Buna karşı nukleolar birleşmenin tam olmadığı G₁ evresinde ve nukleolar ayrışmanın gözlemlendiği mitoz evrelerinde Ag-NOR'lar birbirinden uzak ve dağınık olarak bulunduklarından tek tek sayılabilirler. Bu nedenle de Ag-NOR sayısı bu evrelerdeki hücrelerde yüksek bulunmaktadır. Bu görüşün geçerliliğini araştırmak amacıyla değişik tümöral lezyonlarda Ag-NOR skoru ile Ki-67 indeksi arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ki-67 antikoru G₀ evresi dışındaki tüm evrelerde bulunan bir nukleolar antijeni (nuclear proliferation associated antigen) saptanmakta, böylece proliferasyon fazındaki hücreleri belirlemektedir (24). Meme tümörleri (2,4,19,51) non-Hodgkin lenfomalar (27), glial tümörler (28), beyin tümörleri (48), meningeal tümörler (38) ile yapılan çalışmalarda Ag-NOR skoru ile Ki-67 indeksi arasında anlamlı ve doğrusal bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Ayrıca meme tümörlerinde östrojen reseptör negatifliği ile Ag-NOR sayısı arasında da anlamlı ve doğrusal ilişki varlığına dikkat

çekilmiştir (2,51). Tonsil dokusunda yapılan çalışmada; Ki-67 ve Ag-NOR boyamaları aynı kesite birlikte uygulanmış, Ki-67 pozitifitesi gösteren hücrelerin Ki-67 negatif hücrelere göre çok daha yüksek Ag-NOR sayısı içerdiği saptanmıştır. Ki-67 negatif hücreler; küçük, tek ya da az sayıda Ag-NOR benekciği içerirken, Ki-67 pozitif hücreler çok sayıda, dağınık Ag-NOR benekciği içermektedir (44). Bu bulgulara karşı, akciğer tümörlerinde (60) ve glial tümörlerde (38) Ki-67 indeksi ile Ag-NOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur.

Flow sitometrik çalışmalarda ise proliferatif indeks ile Ag-NOR değerleri karşılaştırılmış, değişik sonuçlar alınmıştır. Bazı çalışmalarda anlamlı doğrusal ilişki izlenmiştir (7,43). Bazı lezyonlarda ise çok belirgin derecede anlamlı ilişki izlenememiştir (25,67). Rectal adenokarsinomlarda ise anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (26). Çoğalma hızı, çift katına ulaşma zamanı (doubling time) farklı iki neuroblastom hücre kültüründe yapılan çalışmada, çoğalma hızı ile Ag-NOR sayısı arasında anlamlı ve doğrusal bir ilişki izlendi. Kültür ortamındaki serum yoğunluğu arttırıldıkça çoğalma hızı artmakta, çift katına ulaşma zamanı kısaltmakta, Ag-NOR sayısı artmaktadır (17). Diğer bir çalışmada ise, 12 farklı tümör hücre kültüründe (H)³ timidin işaretleme yöntemi kullanılarak çoğalma hızları ölçüldü. Çoğalma hızı ile Ag-NOR sayısı arasında ileri derecede anlamlı ve doğrusal bir ilişki gözlemlendi (18).

4- Gen Amplifikasyonu

Bir hücrede habis dönüşüme yol açan olaylar zincirinin başlangıcında onkogenleri etkileyen somatik mutasyonlar bulunabilir. Bazı sarkom ve karsinom türlerinde (33), bazı lösemi ve lenfomalarda (29), testis tümörlerinde (14), NOR yer değiştirmeleri (translokasyonları) ve ektopik NOR lokalizasyonları belirlenmiştir. Ayrıca sıçan lösemi hücrelerinde NOR yer değiştirmeleri sonucu C-alb onkogeni aktive olmuştur (63). Ancak bu olayların habis dönüşüme yol açtığı veya tüm tümöral olaylarda bu tip değişikliklerin bulunacağı şeklinde bir genelleme yapmak güçtür. Nitekim bazı lösemi ve solid tümörlerde bu tip değişikliklere rastlanmamıştır (56, 68).

Ancak olayın bir diğer yanı daha vardır. Habis değişime uğramış hücreler arasında daha agresif fenotipe sahip hücre klonu daha hızlı çoğalarak ön plana geçecektir. Örneğin hızlı seyirli, kötü prognozlu, ileri evreli nöroblastomlarda; çoğalma uğramış n-myc onkogeni içeren hücre klonlarına daha sık rastlanmaktadır. N-myc onkogeninin çoğalması sonucunda daha agresif bir tümör hücre klonu oluştuğu ve buna bağlı olarak klinik seyrin hızlandığı düşünülmektedir (3). İşte bu mekanizmaya benzer şekilde, rDNA gen çoğalmasının daha agresif bir tümör klonu yaratabileceği düşünülebilir. Çoğalma uğramış aktif rDNA segmentleri içeren tümöral hücre topluluğu protein yapım hızı açısından diğer hücre gruplarına üstünlük sağlayacak, daha hızlı çoğalacak, ön plana çıkacak ve daha agresif davranışlı bir tümör fenotipi oluşturacaktır. Habis melonon, kronik myeloid lösemi, T hücreli lösemi kültürlerinde bu görüşü destekleyen çalışmalar yapılmıştır (32). Ayrıca sıçan hepatoma hücrelerinde, sıçan sarkom hücrelerinde, ertirolösemilerde çoğalma uğramış rDNA gen segmentleri taşıyan ve "homojen boyanmış bölgeler" ("Homogeneously staining region"="HSR") adı verilen yapılar ile karakterize özel kromozomlar saptanmıştır (32). İnsan MeWo melanom hücre kültürlerinde saptanan 10 ayrı karyotipe sahip hücre toplulukları genetik olarak incelendiğinde HSR içeren hücre tiplerinin diğerlerinden daha saldırgan davrandığı görülmüştür. HSR içeren hücre toplu-

lukları arasında da rDNA segmentleri daha aktif olanların daha agresif davrandığı görülmüştür (32).

Sonuç olarak rDNA'ların herhangi bir şekilde çoğalma uğraması veya aktive olması hücreye büyüme ve çoğalma avantajı sağlamaktadır. Ancak bu mekanizmanın normal ve tümöral lezyonlarda gözlenen Ag-NOR farklılıklarının tümünden sorumlu olduğunu söylemek bugün için zordur. Kesin sonuçlara varabilmek için çok sayıda ve değişik türde hücre kültürlerini ele alan ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5- Hücresel Farklılaşma

Ag-NOR farklılıkları konusunda henüz ayıntılı olarak incelenmemiş ve tam açıklanmamış diğer bir mekanizma, hücresel farklılaşma düzeyi ile ilişkilidir. Primitif hücrelerden olgun hücrelere doğru gidildikçe Ag-NOR sayısında azalma dikkati çekmektedir. Bu değişiklik çoğalma hızındaki azalmanın bir sonucu olabilir.

Kemik iliği hücrelerinde olgunlaşma ve tam farklılaşma ile birlikte Ag-NOR sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (59). Yaşlanma ile birlikte periferik kan lenfositlerinde Ag-NOR sayısı azalmaktadır (10). PHA ile blastik değişime uğratılan lenfositlerde başlangıçta artan Ag-NOR sayısı, blastik dönemden olgun döneme geçildiğinde tekrar azalmaktadır (10). Premiyelositik lösemi kültürü HL-60'da yapılan çalışmada, kültür ortamına farklılaşmayı sağlayıcı ajan dimetil-sülfoksit (DMSO) katıldığında farklılaşma ile birlikte Ag-NOR sayısında azalma izlenmiştir (52). Melanom hücre kültürü HXG-2 ortamına DMSO, retinol, retinoik asit gibi farklılaştırıcı maddeler katıldığında farklılaşma yönünde değişiklikler ve çoğalma hızında yavaşlama ile birlikte Ag-NOR sayısında azalma gözlenmiştir (71).

Hem rDNA aktivitesi hem de çoğalma hızı, hücrenin farklılaşma düzeyine göre değişiklikler gösterecektir. Ag-NOR farklılıklarının asıl nedeni olasılıkla rDNA aktivitesindeki ve çoğalma hızındaki farklılıklardır. Bugüne kadar hücresel farklılaşmanın Ag-NOR sonuçlarına etkileri daha çok metafaz kromozom yaymalarında incelenmiştir. Bu çalışmalarda ele alınan metafazik Ag-NOR değerleri bir önceki interfazdaki rDNA aktivitesini yansıtmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalar hücresel farklılaşma düzeyi - rDNA transkriptif aktivitesi - Ag-NOR ilişkisini değerlendirmektedir. Hücresel farklılaşma - proliferatif aktivite - Ag-NOR ilişkisini değerlendirmek için interfazik Ag-NOR incelemelerini de ele alan ayrıntılı çalışmalara gerek vardır. Ayrıca farklılaşma düzeyi ile Ag-NOR skoru arasındaki ilişkilerin temelinde rDNA segmentlerini etkileyen gen çoğalımı veya baskılama mekanizmalarının ne derece etkili olduğu bilinmemektedir. Bu konuda, olgunlaşma gösteren tümör hücre dizilerini ele alan ayrıntılı genetik incelemelere gerek vardır.

Hücreler arasındaki Ag-NOR farklılıklarının nedenini araştırmak amacıyla nöroblastom-ganglionöroblastom-ganglionörom tümör serisi ve normal ganglion hücreleri; methyl green pyronin ve Ag-NOR yöntemleri kullanılarak incelendi (21). Primitif nöroblastik hücreden olgun ganglion hücrelerine doğru gidildikçe proliferatif aktivitenin azaldığı kabul edilen bu hücre serisinde total Ag-NOR sayısının matürasyonla beraber giderek azaldığı buna karşılık nukleolar ve sitoplazmik RNA düzeyinin giderek arttığı gözlemlendi (21). Bu nedenle, incelenen hücre serisinde, Ag-NOR sayı farklılığının tek başına rDNA aktivitesindeki değişikliklere bağlanamayacağı sonucuna varıldı.

Proliferatif aktivitesi giderek azalan bu tümör serisinde Ag-NOR sayısının da buna paralel olarak azalmış olması "interfazik Ag-NOR sayısının rDNA aktivitesinden çok prolife-

ratif aktiviteye bağlı olarak değiştiği" fikrini desteklemektedir. Bu görüşe göre, proliferatif aktivitesi yüksek hücre topluluklarında G₀ fazındaki hücre oranı azalır. Hücrelerin önemli bir bölümü nukleolus organizasyonunun tam olarak sağlanmadığı G₁ fazında bulunur. Nukleolar ayrışmanın tam olduğu mitoz evrelerinde bulunan hücre sayısı da normale göre artmıştır. Ag-NOR'lar ya tamamen dağınık olarak ya da prenukleolar cisimcikler halinde, genellikle tek tek sayılabilecek şekilde bulunurlar. Bu nedenle ortalama Ag-NOR sayısı yüksek bulunur.

Buna karşılık proliferatif aktivitesi düşük hücre topluluklarında G₀ fazında bulunan hücre oranı artmıştır. Ag-NOR'lar G₀ fazında nukleolusları oluşturacak şekilde bir araya gelmişlerdir. Küçük bir alanda sıkışık olarak bulunurlar. Tek tek sayımları güçtür. Bu nedenle Ag-NOR sayısı düşük bulunur. Proliferatif aktivitesi yüksek hücrelerde Ag-NOR sayısı nukleolar ayrışma-birleşme özelliğine (hücre siklusuna) bağlı olarak proliferatif aktivitesi düşük hücrelerde metabolik aktiviteye bağlıdır. Metabolik aktivite arttıkça hücrenin rRNA'ya olan gereksinimi artar. Bu gereksinimi karşılamak amacıyla aktif rDNA sayısı ve buna bağlı olarak da Ag-NOR sayısı artar. Ancak bu tip hücrelerdeki Ag-NOR'lar proliferatif aktivitesi yüksek hücrelerdeki gibi dağınık halde bulunmayıp nukleolus içinde toplu olarak bulunurlar. Proliferatif ve metabolik aktivitesi düşük hücrelerde, az sayıda aktif rDNA'nın bir arada topluca bulunması nedeniyle Ag-NOR'lar tek küçük bir benek halinde izlenir (Örneğin olgun lenfositlerde olduğu gibi). Buna karşılık proliferatif aktivitesi düşük, ancak metabolik aktivitesi yüksek hücrelerde ise rRNA sentezindeki artış nedeniyle nukleoluslar genişler. Aktif rDNA sayısındaki artışa bağlı olarak çoğalan Ag-NOR benekcikleri genişlemiş nukleolus içinde, nispeten birbirlerinden ayrı, tek tek seçilebilir halde bulunurlar. Ag-NOR sayısı proliferatif ve metabolik aktivite göstermeyen hücrelerden daha fazladır.

Diagnostik histopatoloji alanında Ag-NOR yöntemi ile yapılan çalışmalardan bir kısmında Ag-NOR sayısının selim ve habis lezyonların ayrımını her zaman sağlamadığı görülmektedir.

Gerçekten de Şema 1'de belirtildiği gibi yüksek düzeyde metabolik veya reaktif karakterde proliferatif aktivite gösteren lezyonlarda Ag-NOR sayısı habis tümör düştündürecek düzeyde artmış olabilir. Böyle durumlarda ön planda olan Ag-NOR organizasyon tipinin belirlenmesi, sorunun çözülmesine yardımcı olabilir. Tam nukleolar ayrışmanın, prenukleolar organizasyonun ön planda olduğu durumlarda daha çok habis lezyonun varlığı düşünülebilir. Buna karşılık nukleolar organizasyonun ön planda olduğu Ag-NOR artışlarında daha çok yüksek metabolik aktivasyon gösteren lezyonların varlığı söz konusudur. Ancak tüm bunlara karşı metabolik ve proliferatif aktivasyonun birlikte bulunduğu selim karakterde reaktif lezyonların; metabolik aktivasyonun da belirgin olduğu nispeten düşük proliferasyon hızı gösteren habis lezyonların da var olabileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Anonymous. NORs-A new method for the pathologist, *Lancet* 1: 1413-1414, 1987.
2. Bondi A, Capucci A, Ghidon D, et al: Nucleolar organizer region-associated proteins (AgNORs), hormone receptors and proliferating cells fraction in breast cancer. *Pathology Research and Practice*, 185: 21 Abstract, 1989.
3. Brodeur GM and Seeger RC: Gene amplification in human neuroblastoma. Basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet. Cytogenet.* 19: 101-111,

- 1986.
4. Canepa M, Gambini C, Sementa AR, et al: Nucleolar organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: A comparative study. *Pathologica* 82: 125-132, 1990.
5. Croce CM, Talavera A, Basilico C, et al: Suppression of production of mouse 28S ribosomal RNA in mouse-human hybrids segregating mouse chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 694-697, 1977.
6. Crocker J, Skilbeck N: Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: A quantitative study. *J. Clin. Pathology* 40: 885-889, 1987.
7. Crocker J, Macatney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's Lymphomas. *J. Pathology*, 154: 151-156, 1988.
8. Crocker J, Egan MJ: Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. *J. Pathology* 156: 233-239, 1988.
9. Crocker J: Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE, ed. *Current Topics in Pathology*. Heidelberg: Springer, 1990: 91-149.
10. Das BC, Rani R, Mitra AB, et al.: The number of silver-staining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. *Mechanisms of Ageing and Development*, 36: 117-123, 1986.
11. De Capoa A, Baldini A, Marlekaj P, et al: Hormone-modulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NORs. *Cell Biol. Int. Reports* 9: 791-796, 1985.
12. De Capoa A, Marleka P, Baldini A.: The transcriptional activity of individual ribosomal DNA gene clusters is modulated by serum concentration. *J. Cell Sci.* 74: 21-35, 1985.
13. De Leon-Martin PA, Muneses C, Picciano S, et al.: Differential silver staining in lymphocytes and lymphoblastoid cell cultures. *Cytobios* 55: 113-123, 1988.
14. De Lozier-Blanchet CD, Walt H, Engel E.: Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumors. *Cytogenet. Cell. Genet.* 41: 107-113, 1986.
15. Derenzini M, Farabegoli F, Pession A.: Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centers of human lymphocytes after stimulation of transcription. *Exp. Cell. Res.* 170: 31-41, 1987.
16. Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzini P. et al.: Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Vichow Archiv B Cell Pathology*, 54: 334-340, 1988.
17. Derenzini M, Pession A, Farabegoli F.: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am. J. Pathology* 134: 925-932, 1989.
18. Derenzini M, Pession A, Trere D.: Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab. Investigations* 63: 137-140, 1990.
19. Dervan PA: Breast carcinoma kinetics: Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki-67 scores. *Am J. Clin. Pathology* 92: 401-407, 1989.
20. Dimova RN, Markov DV, Gajdardjieva KC, et al.: Electronmicroscopic localization of silver staining NOR-proteins in rat liver nucleoli upon D-galactosamine block of transcription. *Eur. J. Cell. Biol.* 28: 272-277, 1982.
21. Doğan Ö.: Nöroblastom-Ganglionöroblastom-Ganglionörom tümör serisinde Ag-NOR yöntemi. (Uzmanlık tezi), İstanbul Tıp Fakültesi Tez Bürosu, İstanbul, 1991.
22. Egan MJ, Crocker J.: Evaluation of nucleolar organizer regions in pulmonary pathology. *Thorax* 45: 225-232, 1990.
23. Fakan S, Hernandez-Verdun D: The nucleolus and nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell* 56: 189-206, 1986.
24. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al.: Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*: 31: 13-20, 1983.
25. Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, et al: Silver-binding nucleolar organizer region (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. Pathology* 157: 307-311, 1989.
26. Griffiths AP, Butler CW, Roberts P, et al.: Silver-stained structures (AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J. Pathology*, 159: 121-127, 1989.
27. Hall PA, Crocker J, Watts A, et al.: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12: 373-381, 1988.
28. Hara A, Hirayama H, Sakai N, et al.: Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surg. Neurol.* 33: 320-324, 1990.
29. Henderson AS, Megraw-Ripley S.: Rearrangements in rDNA-bearing chromosomes in cell lines from neoplastic cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 6: 1-16, 1982.
30. Hernandez-Verdun D., Derenzini M, Bouteille M.: Relationship between the AgNOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug induced RNA synthesis inhibition. *J. Ultrastruct. Res.* 88: 55-65, 1984.
31. Hirschfield LS, Harrison G, Bhuiya T, et al: Correlation between argyrophilic nucleolar organizer region counts (AgNORs) and DNA content in breast tumor imprints. *Lab Invest.* 64: 1, 1991.
32. Hough MR, White BN, Holden JJA: Relative tumorigenicities of hybrid cells with and without HSR-bearing chromosomes from a human melanoma cell line. *Int. J. Cancer* 44: 360-366, 1989.
33. Hubbel HR- HSU TC: Identifications of nucleolar organizer regions (NORs) in normal and neoplastic human cells by the silver staining technique. *Cytogenet. Cell. Genet.* 19: 185-196, 1977.
34. Hubbel HR: Silver staining as indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology*, 60: 285-294, 1985.
35. Jan-Mohamed RM, Armstrong SJ, Crocker J, et al.: The relationship between number of interphase NORs and NOR-bearing chromosomes in non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Pathology*, 158: 3-7, 1989.
36. Jan-Mohamed RM, Armstrong SJ, Crocker J, et al.: Abnormally located metaphase AgNORs and their relationship to interphase AgNOR number in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Pathology* 160: 158 Abstract 1990.
37. Kajiura K, Nishizaki T, Orita T, et al.: Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J. Neurosurgery* 73: 113-117, 1990.
38. Maier H, Morimura T, Ofner D, et al.: Argyrophilic nucleolar organizer region proteins (Ag-NORs) in human brain tumors: relations with grade of malignancy and proliferation indices. *Acta Neuropathologica* 80: 156-162, 1990.
39. Miller OJ, Miller DA, Dev VG, et al.: Expression of human and suppression of mouse nucleolus activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4531-4535, 1976.
40. Mkhitarova EV, Egorina NA, Garkavtsev IV, et al.: Relationship between intensity of transcription and content of rRNA genes in individual nucleolus-organizing regions of human chromosomes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 105: 78-82, 1988.
41. Moran K, Cooke T, Forster G, et al.: Prognostic value of nucleolar organizer regions and ploidy values in advanced colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 76: 1152-1155, 1989.
42. Morton CC, Brown JA, Holmes WM, et al: Stain intensity of nucleolus organizer region reflects incorporation of uridine in to mature ribosomal RNA. *Experimental Cell Research*. 145: 405-413, 1983.
43. Mourad W, Katr R, Sembrera D, et al: Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in fine needle aspiration of lymphoproliferative disorders: A comparative study correlating two AgNOR counting methods with acridine orange flow cytometry. *Lab. Invest* 64 (1): 27A 1991.
44. Murray PG, Boldy DAR, Crocker J, et al.: Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin section. *J. Pathology* 159: 169-172, 1989.
45. Napier SS, Lamey PJ, McCusker G, et al.: Lack of correlation between quantitative expression of AgNORs and the histological appearances and regression in an adriamycin treated experimental animal tumour. *J. Pathology* 160: 155 Abstract 1990.
46. Orita T.: Nucleolar organizer regions in meningioma, *Neurosurgery*, 26: 43-46, 1990.
47. Peebles SA, McNicol AM: AgNOR counts in rat anterior pituitary corticotrophs following bilateral adrenalectomy. *J. Pathology* 155: 346 Abstract 1988.
48. Plate KH, Rüschoff J, Behnke J, et al: Proliferative potential of human brain tumours as assessed by nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67 immunoreactivity. *Acta Neurochirurgica* 104: 103-109, 1990.
49. 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 level. *Histochemical Journal*. 18: 5-14, 1986.
50. Ploton D, Thiry M, Menager M, et al.: Behavior of nucleolus during mitosis A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the AgNOR staining procedure. *Chromosoma* 95: 95-107, 1987.
51. Raymond WA, Leong ASY: Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Human Pathology*, 20: 741-746, 1989.
52. Reeves BR, Casey G, Honeycomb JR: Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizer regions in promyelocytic leukaemia cell line HL-60. *Cancer Cytogenet.* 13: 159-166, 1984.
53. Rosa J, Mehta A, Filipe MJ: Nucleolar organizer regions, proliferative activity and DNA index in gastric carcinoma. *Histopathology*. 16: 614-616, 1990.
54. Rüschoff J.: Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. *Pathology Research and practice* 186: 85-91, 1990.
55. Sanchez-pina MA, Medina FJ, Fernandez-Gomes ME: Ag-NOR proteins are present when transcription is impaired. *Biol. Cell*. 50: 199-202, 1984.
56. Sato Y, Abe S, Kubota K, et al.: Silver stained nucleolar organizer regions in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia patients. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 23: 37-45, 1986.
57. Scheer U, Rose KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cell and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1431-1435, 1984.
58. Schmiady H, Münke M, Sperling K.: Ag-staining of nucleolus organizer regions on human prematurely condensed chromosomes from cells with different ribosomal RNA gene activity. *Exp. Cell. Res.* 121: 425-428, 1979.
59. Smetana K, Likovsky Z.: Nucleolar silver stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. *Cell Tissue Res.* 237: 367-370, 1984.
60. Soomro IN, Whimster W: Growth fraction in lung tumours determined by Ki-67 immunostaining and comparison with Ag-NOR scores. *J. Pathology* 162: 217-222, 1990.
61. Soosay G, Happerfield L, Papadakis L, et al.: Evaluation of immunohistochemistry electron microscopy and silver impregnation of nucleolar organizer re-

gions in the differentiation between malignant mesothelioma, metastatic adenocarcinoma and reactive mesothelial hyperplasia. *J. Pathology* 157: 172, Abstract 1989.

62. Suresh UR, Chawner L, Buckley C: Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. *J. Pathology* 160: 213-215, 1990.
63. Takahashi R, Mihara K, Maeda S, et al.: Secondary activation of c-abl may be related to translocation to the nucleolar organizer region in an in vitro cultured rat leukemia cell line [K3D]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1079-1083, 1986.
64. Takeuchi IK, Takeuchi YK: Ultrastructural localization of AgNOR proteins in full-grown oocytes and preimplantation embryos of mice. *J. Electron Microscopy*, 35: 280-287, 1986.
65. Tanaka T, Takeuchi T, Nishikawa A, et al: Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 1047-1051, 1989.

66. Tham KT, Page DL: AgNOR and Ki-67 in Breast Lesions. Editorial. *Am. J. Clin. Pathology*, 92: 518-520, 1989.
67. Thickett KM- Griffin NR, Griffin AP, et al.: A study of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection. *Int. J. Gynecological Pathology* 8: 331-339, 1989.
68. Trent JM, Carlin DA, Davis JR: Expression of silver stained nucleolar organizing regions (AgNORs) in human cancer. *Cytogenet. Cell. Genet.* 30: 31-38, 1981.
69. Underwood JCE: Nucleolar organizer regions as a diagnostic discriminant for malignancy. *J. Pathology*, 155: 95-96, 1988.
70. Wachtler F, Hopman AHN, Wiegant J, et al.: On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new non-autoradiographic in-situ hybridization method. *Experimental Cell Research*, 167: 227-240, 1986.
71. Yongshan Y, Stanley WS: Effect of differentiating agents on nucleolar organizer region activity in human melanoma cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 31: 253-262, 1988.