

SERÖZ SIVILARDA REAKTİF, MALİGN MEZOTELYAL VE MALİGN EPİTELYAL HÜCRELERİN Ag-NOR YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ (*)

Dr. Gülnaz KERVANCIOĞLU (**) • Doç. Dr. Dilek YILMAZBAYHAN (**) • Uzm. Dr. Öner DOĞAN (**)
 Prof. Dr. Uğur HACIHANEFİOĞLU (**)

ÖZET: Bu çalışmada, 84 vakaya ait 54 plevra, 28 periton, 2 perikard sıvısından hazırlanan yayma preparatları Papanicolaou boyası ile boyanıp sitolojik olarak gruplandırıldı. Bu vakalar Ag-NOR yöntemi uygulanarak ışık mikroskopunda incelendi. Reaktif mezotel, malign mezotelyoma ve adenokarsinom hücrelerinde Ag-NOR sayı ve dağılım özellikleri araştırıldı. Bu çalışmamızın daha önceki çalışmalardan farkı ve özelliği Ag-NOR sayım esasına dayanan ayırıcı tanıda sıvılarda ilk kez dörtlü sayım sisteminin getirilmesi ve bu sistemin alınan sonuçlara göre üstünlüğünün saptanmasıdır. Reaktif mezotel hücrelerindeki Ag-NOR sayısının, malign mezotelyoma ve adenokarsinom hücrelerinde istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde ($p < 0.001$) düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca malign mezotelyoma hücreleri ile adenokarsinom hücreleri arasında, Ag-NOR sayı ve dağılım özellikleri açısından belirgin farklılıklar görüldü. Özellikle Ag-NOR dağılımı bu iki grubun ayırımında değerli bir kriter olarak dikkati çekti. Bu veriler ışığında Ag-NOR yönteminin seröz sıvıların sitolojik incelemesinde, hücre tiplendirilmesi ve malignitenin belirlenmesi aşamasında ekonomik, rutinde kolay uygulanabilir yardımcı bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

SUMMARY: "Value of AgNOR method in the differential diagnosis of reactive, malignant mesothelial and malignant epithelial cells in serous effusions". In this study, 54 pleural, 28 peritoneal and 2 pericardial effusions of 84 cases are examined. They're stained by AgNOR method, and the number and distribution pattern of AgNOR dots are determined. The difference of this study from others we've performed before is the use of a different counting system. The results showed us that this system is superior to others. AgNOR counts of reactive mesothelial cells were significantly lower ($p < 0.001$) than those of malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. There were also significant differences between the numbers and distribution patterns of AgNOR's of mesothelioma cells and adenocarcinoma cells. Especially the Ag-NOR distribution pattern was a valuable criteria in the differentiation of these two groups. We conclude that AgNOR method can be used as an economic, easily applicable supplementary method in cytologic differential diagnosis of serous effusions.

GİRİŞ

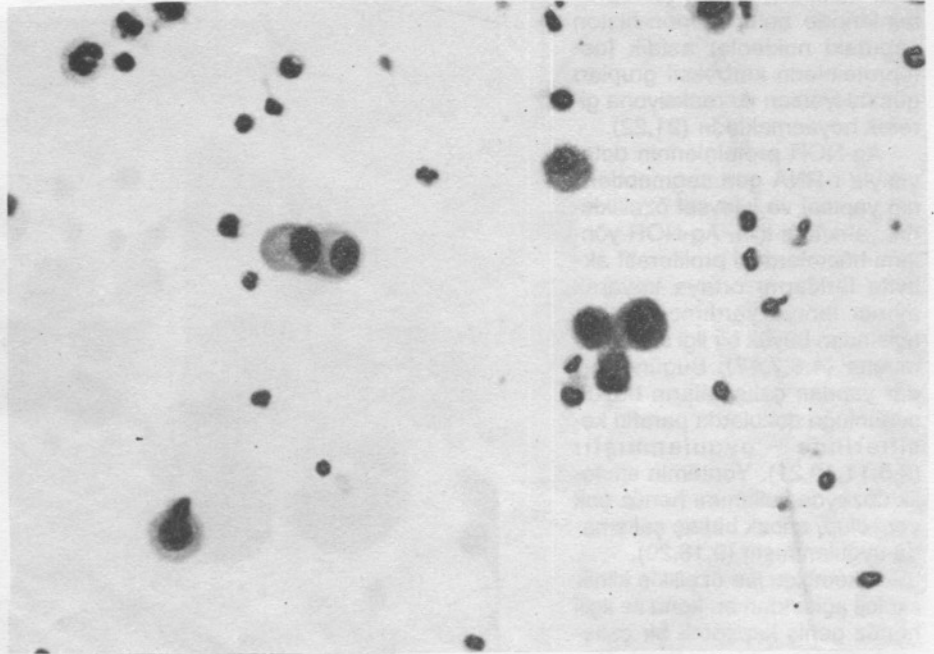
Yüksek düzeyde metabolik aktivite ve protein sentezinde artış gösteren hücrelerde nukleolusun çok belirgin olduğu ve hücresel aktivite ile nukleolus arasında sıkı bir ilişkinin varlığı bilinmektedir. Diğer taraftan malign hücrelerde çoğalma hızı ile protein sentezindeki artışın da nukleoluslara yansiyarak büyüklük, sayı ve şekil bozuklukları oluşturdukları görülmektedir (3,13,23).

Özellikle son yıllarda submikroskopik düzeyde yapılan çalışmalar bu konuya ışık tutmaktadır (20). Bu araştırmalarda nukleolusun r-RNA, ribozom ve protein sentezinde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur.

"Nukleoler Organizer Region" veya kısaca NOR aktif ribozomal transkripsiyondan sorumlu r-DNA gen segmentlerine karşılık gelen kromozom bölgeleridir (3). NOR'ların insan hücresinde yer aldığı bölgeler ise diploid genomun D ve G grubu 13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı akrosentrik kromozomların kısa kolları üzerinde bulunurlar (A) ve

metafazda kromozomlar üzerinde yer alan NOR'lar interfazda toplanarak nukleolusları meydana getirirler (3,16).

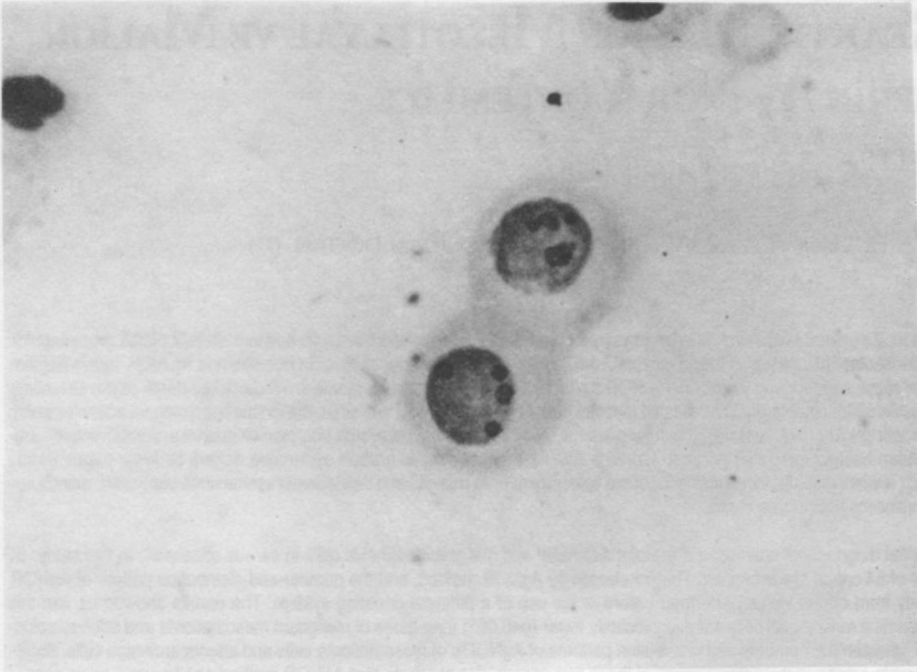
Bu aşamada NOR'ların belirlenmesi ve bazı özelliklerinin ortaya konulması hücredeki aktif çoğalmayı gösterebileceği için, bu bölgelerin görünür hale getirilme yöntemleri önem kazanmaktadır.



Resim 1: Reaktif mezotel hücreleri (Papanicolaou x 500).

* Dr. Gülnaz Kervancıoğlu'nun Doktora Tezinin bir bölümünün değerlendirilmesidir. İstanbul, 1991.

** İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.



Resim 2: Reaktif mezotel hücrelerinde düzgün ve az sayıda nukleolus şeklinde toplanan Ag-NOR benekleri (Ag - NOR + Eozin x 1250).

NOR'ların ortaya konulmasında kullanılan yöntemlerden biri de, koloidal gümüş boyama tekniği olan Ag-NOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions) yöntemidir. Bu yöntemle NOR'lar siyah benekler şeklinde boyanarak görülebilir ve sayılabilir hale gelmektedir ve Ag-NOR benekleri ya da kısaca Ag-NOR'lar olarak isimlendirilmektedir (8,10,17).

Aktif r-RNA gen segmentlerinde bulunan non-histon yapıdaki nukleoler asidik fosfoproteinlerinde bulunan non-histon yapıdaki nukleoler asidik fosfoproteinlerin karboksil grupları gümüş iyonları ile reaksiyona girerek boyanmaktadır (21,22).

Ag-NOR proteinlerinin dolayısıyla r-RNA gen segmentlerinin yapısal ve işlevsel özelliklerini yansıttığı için, Ag-NOR yöntemi hücrelerdeki proliferatif aktivite farklarını ortaya koyarak ayırıcı tanıya yardımcı olması açısından büyük bir ilgi alanı bulmuştur (4,6,7,17). Bugüne kadar yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu dokularda parafin kesitlerinde uygulanmıştır (2,5,11,19,21). Yöntemin sitolojik düzeyde kullanımı henüz çok yeni olup, ancak birkaç çalışmada uygulanmıştır (9,18,20).

Ülkemizde ise özellikle klinik sitoloji açısından bu konu ile ilgili henüz geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle reaktif çoğalma özelliği gösteren hücrelerle, malign tümör

hücreleri arasında ayırım zorluğu bulunan durumlarda bu yöntemin kullanıma olanaklarını ve pratiğini araştırmak üzere plevra, periton ve perikard sıvılarında yöntemi uygulamış bulunmaktayız.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyalimiz 1987-91 yılları arasında toplanan 84 vakaya ait 54 plevra, 28 periton, 2 perikard sıvısından oluşmaktadır. Bu vakaların 47'si "Güddesel malign tümör hücreleri", 12'si "Malign mezotel hücreleri", 19'u "Reaktif mezotel hücreleri", 6 vaka da "Normal mezotel hücreleri" tanısı almış olup 68 vaka prospektif ve 16 vaka ise retrospektif olarak incelenmiştir. Bu vakaların 62'si İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı materyalinden, 18 vaka Uğur Patoloji Laboratuvarı materyalinden seçilmiştir.

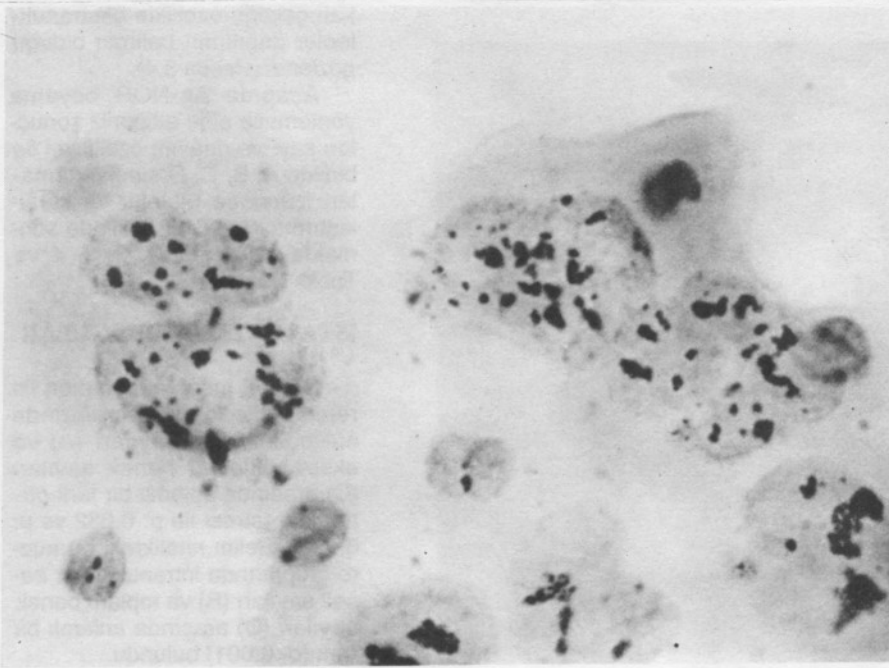
Santrifüj edilen sıvılardan elde edilen yayma preparatlar % 96 etil alkolde 30 dakika tesbit

edildi. Her vakadan retrospektif çalışmalarda 4, prospektif çalışmalarda 2 adet preparat Papanicolaou boya yöntemi (15) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Prospektif olarak incelenen vakalarda ikiye adet preparat Ag-NOR yöntemi ile boyandı. Kullanılan çözelti; 2 birim deionize suda % 50'lik AgNO₃ ve 1 birim deionize su ve



Resim 3: Güddesel malign tümör hücreleri (Papanicolaou x 500).



Resim 4: Guddesel malign tümör hücrelerinde nukleus içerisinde düzensiz olarak dağılmış farklı büyüklük ve sayıda Ag-NOR benekleri (Ag-NOR + Eozin x 1250).

% 1'lik formik asitte % 2'lik jelatinden (12) oluşmaktadır. Her iki çözelti boyama işleminden hemen önce hazırlandı ve kullanıldı. Deionize suya çıkarılan preparatlar kurutulduktan sonra üzerlerine Ag-NOR çözeltisi damlatıldı ve boyama oda sıcaklığında, karanlıkta, 35-45 dakika boyandı. Deionize sudayıkandıktan sonra, preparatlar % 5'lik tiyosülfat çözültesinde 10-15 saniye bekletildi. Eozin ile zıt boyama yapıldı. Yükselen alkol ve ksilol serisinden geçirilip sentetik kapatma maddesi ile kapatıldı.

Retrospektif incelemeye alınan 20 vakaya ait Papanicolaou yöntemi ile boyanmış olan preparatlar boyaları giderilerek (% 0.7-0.9'luk HCl solüsyonunda) AgNOR yöntemi ile boyandı.

Işık mikroskopunda x 1000 büyütme ile yeşil filtre altında incelenen preparatlarda iltihap hücreleri dışında ortalama 25 (10-50) hücre nukleusunda Ag-NOR sayı ve dağılım özellikleri saptandı.

AgNOR noktacıkları nukleolusa benzer biçimde kümelenme (intranukleoler Ag-NOR'lar) veya küçük zerrecikler şeklinde (perinukleoler cisimcikler veya ekstranukleoler Ag-NOR'lar) dağınık olarak görüldü. Bu noktacıkların dağılım özellikleri gözönüne alınarak 4 kademeli bir sayım sistemi geliştirildi ve sırası ile A, B, C, D değerleri belirlendi.

A: Hücrelerdeki nukleoler ci-

sim sayısı,

B: Nukleoler cisim halinde organize olmuş intranukleoler AgNOR sayısı.

C: Nukleus içinde nukleoler cisimler dışında dağınık olarak bulunan ekstranukleoler Ag-NOR'ların sayısı.

D: Toplam AgNOR sayısı (intranukleoler ve ekstranukleoler AgNOR'ların toplamı).

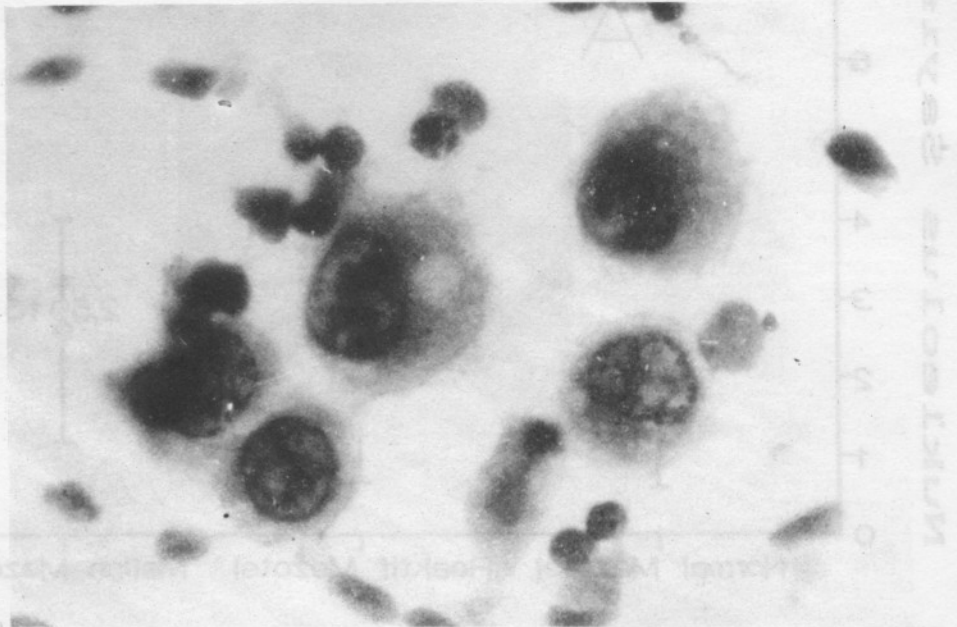
Materyalimiz içerisinde 30 vakanın histopatolojik tanısı, 32 vakanın 6-12 ay arası değişen sürede klinik takip sonuçları bulunmaktadır.

BULGULAR

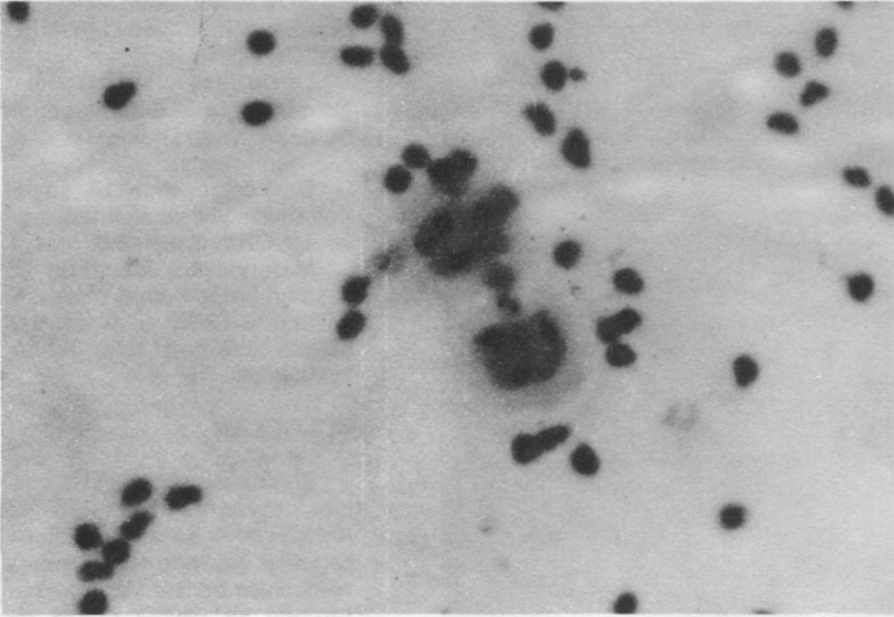
Kontrol olarak kullanılan normal mezotel hücrelerinde AgNOR'ların az sayıda küçük benekler şeklinde kümelenerek nukleolusa benzer yapılar oluşturduğu ve seyrek olarak da ekstranukleoler dağılım gösterdiği izlendi.

Reaktif mezotel hücrelerinde ise Ag-NOR benekleri mezotel hücrelerine benzerlik göstermekle birlikte intranukleoler AgNOR sayısında bir artış gözlemlendi (Resim 1,2).

Malign mezotel hücrelerinde intranukleoler AgNOR benekleri selim nitelikteki hücelere göre daha belirgin bir sayı artışı gösterirken, farklı büyüklükte düzensiz şekilli bu beneklerin daha az bir oranda da ekstranukleoler cisimcikler



Resim 5: Malign mezotel hücreleri (Papanicolaou x 1240).



Resim 6: Malign mezotel hücrelerinde nukleolusları şeklinde toplanmış çok sayıda Ag-NOR benekleri (Ag-NOR + Eozin x 940).

şeklinde dağıldığı görüldü (Resim 5,6).

Guddesel malign tümör hücrelerine AgNOR beneklerinin diğer hücrelere oranla daha fazla sayıda olduğu, şekil ve büyüklük farkları hatta dallanmalar gösteren şekillerin dik-

kati çektiği, özellikle ektranukleoler dağılımın belirgin olduğu gözlemlendi (Resim 3,4).

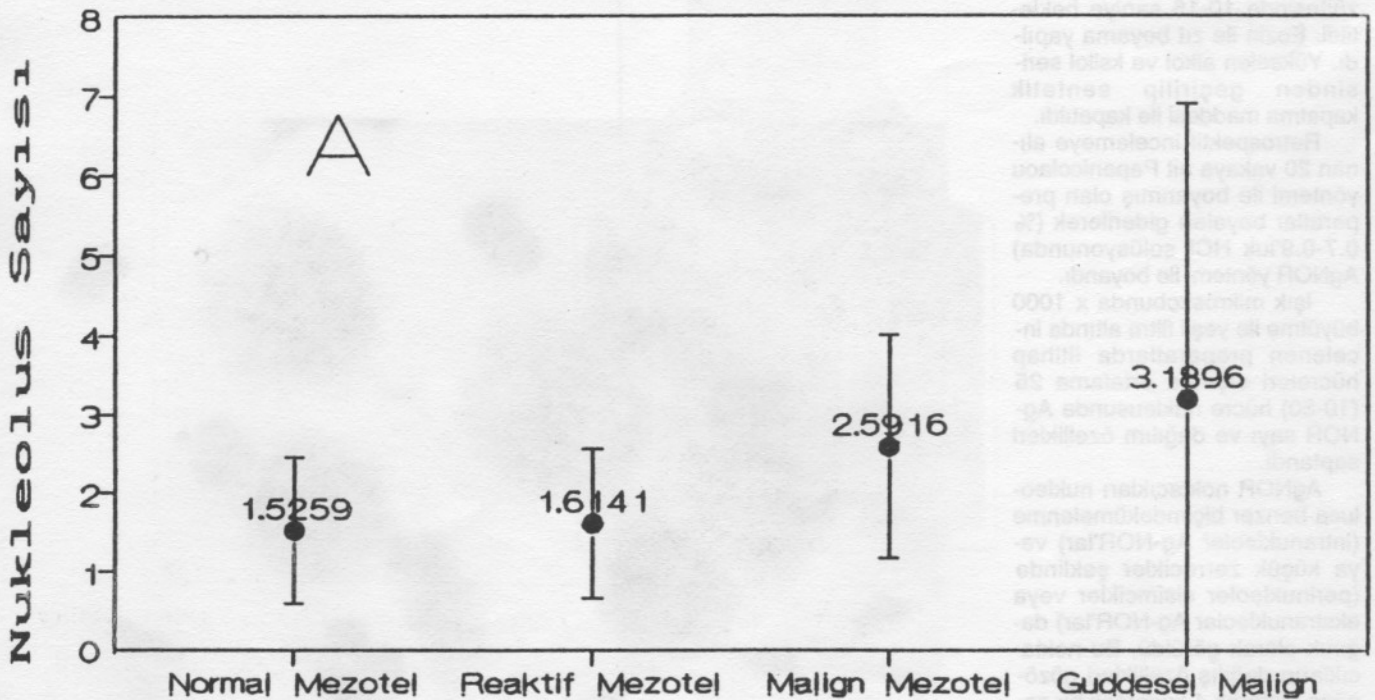
Aşağıda Ag-NOR boyama yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçları sayı ve dağılım özellikleri ile birlikte A, B, C, D sınıflandırmaları içerisinde tablolar ve karşılaştırmalı grafikler şeklinde sunmaktayız (Grafik 1, 2, 3, 4 ve Tablo 1).

İSTATİSTİKSEL BULGULAR

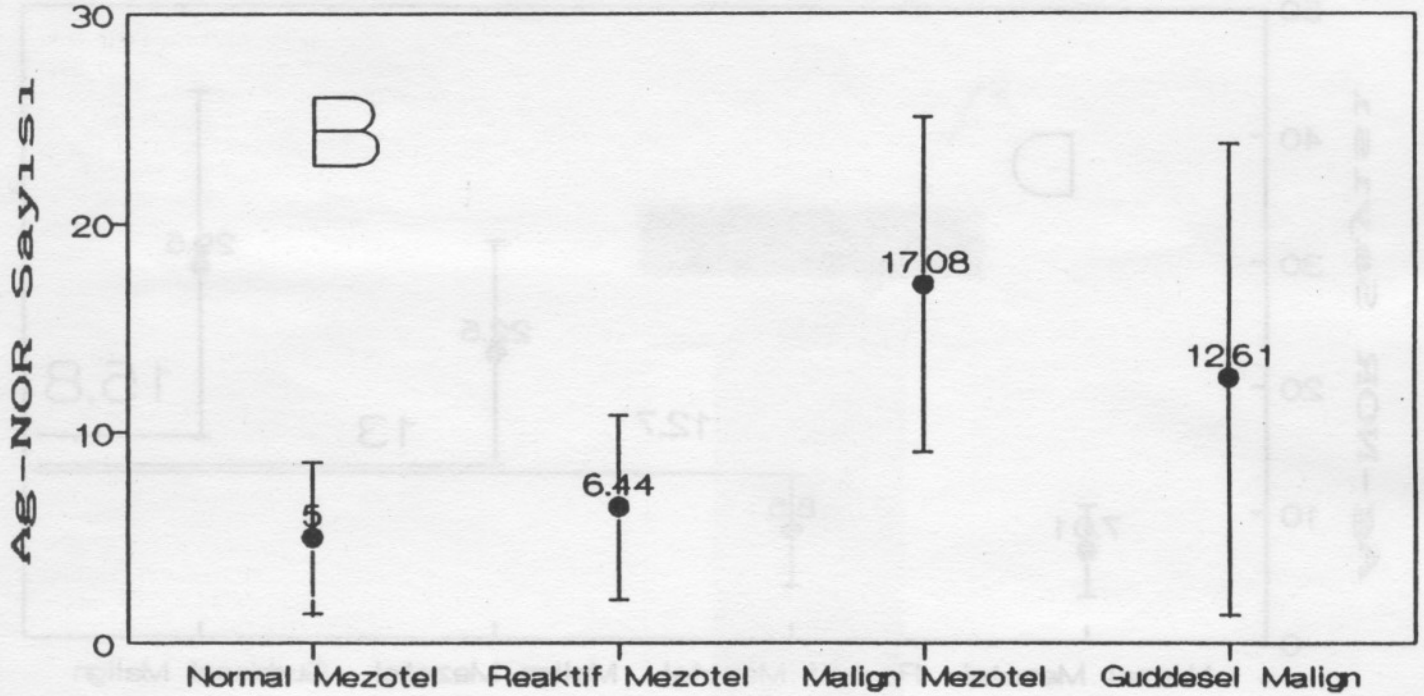
Normal mezotel hücreleri ile reaktif mezotel hücrelerinde nukleoler cisim sayıları (A) ve ektranukleoler benek sayıları (C) arasında anlamlı bir fark görülmedi (sırası ile p: 0.032 ve p: 0.080). Selim nitelikteki bu hücre gruplarında intranukleoler benek sayıları (B) ve toplam benek sayıları (D) arasında anlamlı bir fark (p<0.001) bulundu.

Malign mezotel ve guddesel malign tümör hücrelerinde ise Ag-NOR değerlerinin A, B, C, D gruplarında selim hücrelere oranla anlamlı olarak yüksek olduğu (p<0.001) görüldü.

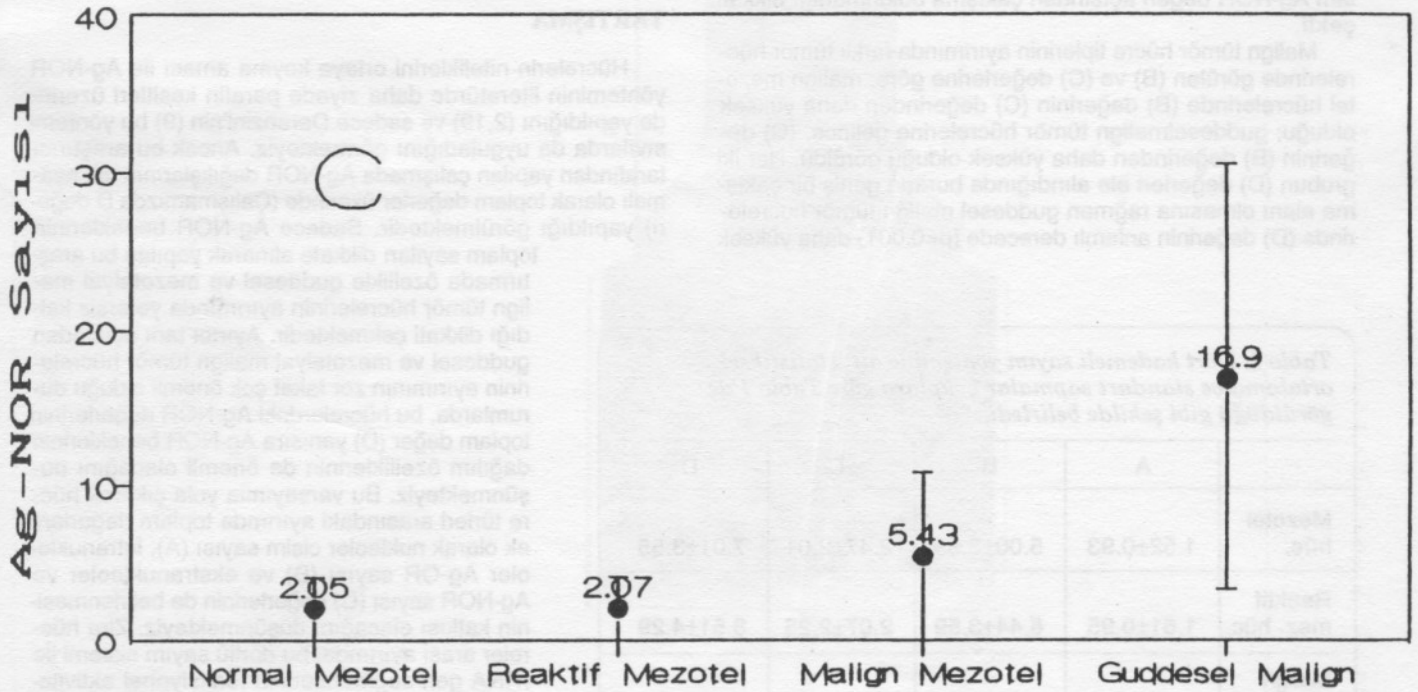
Normal ve reaktif mezotel hücrelerinde toplam Ag-NOR sayılarının (D) üst sınırlarda 12.80; malign hücrelerdeki (D) değerinin alt sınırında ise 13.43 rakamları bulundu (Grafik



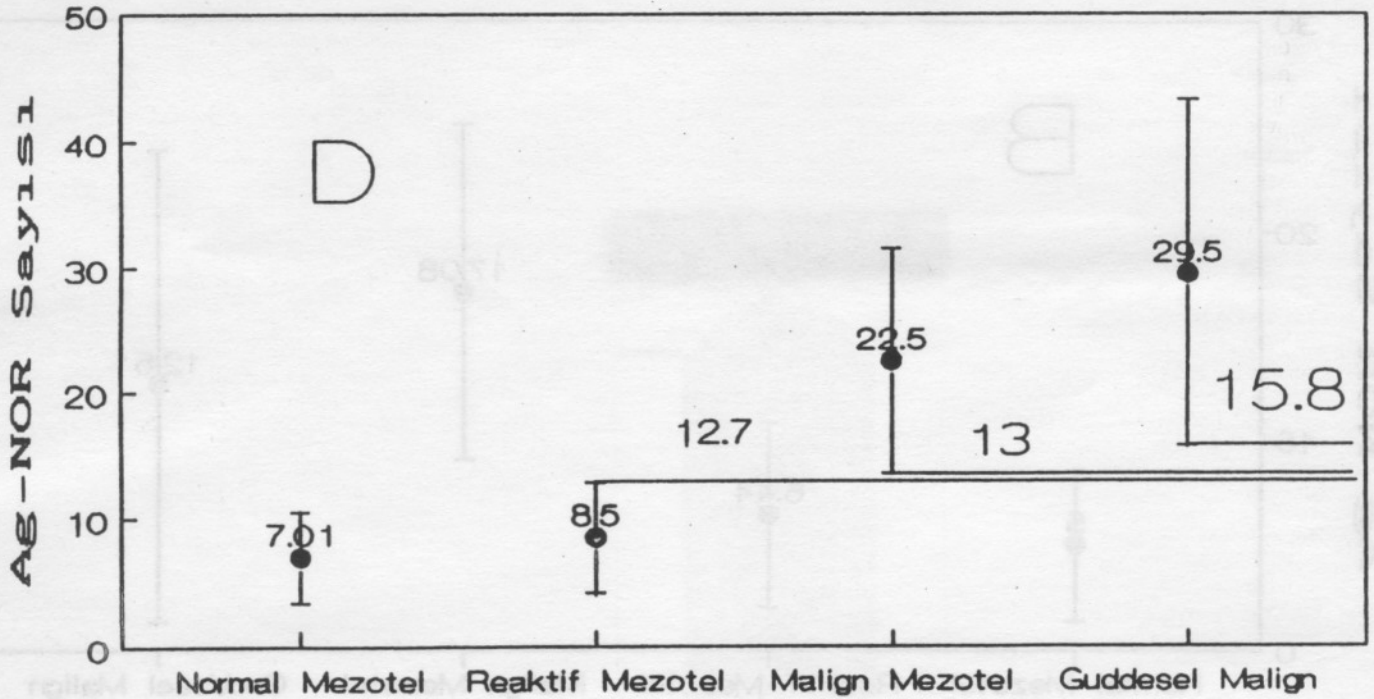
Grafik 1: Dört grup altında toplanan vakaların nukleolus sayılarının istatistiksel ortalama ve standart sapmaları.



Grafik 2 : Dört gurup halinde toplanan vakaların nükleolus için Ag-NOR sayılarının istatistiksel ortalama ve standart sapmaları



Grafik 3 : Dört gurup altında toplanan vakaların nükleolus dışı Ag-NOR sayılarının istatistiksel ortalama ve standart sapmaları



Grafik 4 : Dört gurup altında toplanan vakaların nükleolus içinde bulunan Ag-NOR sayılarının istatistiksel ortalama ve standart sapmaları

4). Buna göre selim hücrelerle malign hücreler arasında toplam Ag-NOR değeri açısından çakışma bulunmadığı dikkati çekti.

Malign tümör hücre tiplerinin ayırımında farklı tümör hücrelerinde görülen (B) ve (C) değerlerine göre; malign mezotel hücrelerinde (B) değerinin (C) değerinden daha yüksek olduğu; guddeselmalign tümör hücrelerine gelince, (C) değerinin (B) değerinden daha yüksek olduğu görüldü. Her iki grubun (D) değerleri ele alındığında burada geniş bir çakışma alanı olmasına rağmen guddesel malign tümör hücrelerinde (D) değerinin anlamlı derecede ($p < 0.001$) daha yüksek

bir düzeye ulaştığı dikkati çekti.

TARTIŞMA

Hücrelerin niteliklerini ortaya koyma amacı ile Ag-NOR yönteminin literatürde daha ziyade parafin kesitleri üzerinde yapıldığını (2,19) ve sadece Derenzini'nin (9) bu yöntemi sıvılarda da uyguladığını görmekteyiz. Ancak bu araştırıcı tarafından yapılan çalışmada Ag-NOR dağılımlarının tek aşamalı olarak toplam değerler üzerinde (Çalışmamızda D değeri) yapıldığı görülmektedir. Sadece Ag-NOR beneklerinin

toplam sayıları dikkate alınarak yapılan bu araştırmada özellikle guddesel ve mezotelyal malign tümör hücrelerinin ayırımında yetersiz kaldığı dikkati çekmektedir. Ayırıcı tanı açısından guddesel ve mezotelyal malign tümör hücrelerinin ayırımının zor fakat çok önemli olduğu durumlarda, bu hücrelerdeki Ag-NOR değerlerinin toplam değer (D) yanısıra Ag-NOR beneklerinin dağılım özelliklerinin de önemli olacağını düşünmekteyiz. Bu varsayımıyla yola çıkarak hücre türleri arasındaki ayırmada toplam değerlere ek olarak nükleoler cisim sayısı (A), intranükleoler Ag-NOR sayısı (B) ve ekstranükleoler ve Ag-NOR sayısı (C) değerlerinin de belirlenmesinin katkısı olacağını düşünmekteyiz. Zira hücreler arası ayırmada, bu dörtlü sayım sistemi ile rRNA gen segmentlerinin fonksiyonel aktivitelerini, nükleolus ayrışma ve birleşme özelliklerini daha iyi bir biçimde ortaya konulabileceğine inanmaktayız. Ancak yöntemin sağlıklı sonuç verebilmesi için dikkat edilmesi gereken bazı teknik hususlar vardır. Bunların başında

Tablo 1: Dört kademeli sayım yöntemine ait istatistiksel ortalama ve standart sapmalar gruplara göre Tablo 1'de görüldüğü gibi şekilde belirledi.

	A	B	C	D
Mezotel hü.	1.52±0.93	5.00±3.59	2.47±2.01	7.01±3.55
Reaktif mez. hü.	1.61±0.95	6.44±3.59	2.07±2.25	8.51±4.29
Malign mez. hü.	2.59±1.41	17.07±8.00	5.42±6.39	22.50±9.07
Guddesel malign tm	3.18±3.70	12.61±11.21	16.90±13.62	29.52±13.73

ortam ısısı ve boyanma süresinin dikkatle ayarlanması gerekmektedir.

Sonuçta bulgular kısmında görüldüğü gibi bu dörtlü sistemle hücreler değerlendirildiğinde normal ve reaktif mezotel hücreleri arasında önemli bir fark bulunmamasına rağmen, selim nitelikteki hücrelerle malign hücreler arasında daha belirgin farklar dikkati çekmektedir. Özellikle gudselsel tümörlerle malign mezotelyomadaki hücreler arasında bu sayım yönteminin daha başarılı olabileceği ortaya konulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc, New York-London. 422-428 (1983).
2. Ayres J., Crocker J., Skilbeck N.: Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organizer region associated proteins. Thorax 43: 366 (1988).
3. Bahr G.: The cell: Basic structure and function. Comprehensive Cytopathology. Ed. M. Bibbo, Saunders Company, Philadelphia (1991).
4. Crocker J., Ayres J., McGovern J.: Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. Thorax 42: 972-975 (1987).
5. Crocker J., McGovern J.: Nucleolar organizer regions in normal cirrhotic and carcinomatous livers. J Clin Pathol 41: 1044 (1988).
6. Crocker J., Nar P.: Nucleolar organizer regions in lymphoma. J Pathol 151: 111-118 (1987).
7. Crocker J., Skilbeck N.: Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: A quantitative study. J Clin Pathol 40: 885-889 (1987).
8. Derenzini M., Betts C., Eusebi V.: Distribution of interphase nucleolar organizer regions and diagnosis of malignancy. Lancet 8553: 268 (1987).
9. Derenzini M., Nardi, Farabegoli F., Otinetti A., Roncali F., Bussolatti G.: Distribution of silver stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. Acta Cytol 33: 491 (1989).
10. Goodpasture C., Bloom S.: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining chromosome. 53: 37 (1975).
11. Howat A., Gird D., Slater D.: Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas. Cancer 63: 474 (1989).
12. Howell W., Black D.: Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protected colloidal developer: A 1-step method. Experientia 36: 1014 (1980).
13. Koss L.: Effusions in the presence of cancer. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. J.B. Lippincott Philadelphia: 911 (1979).
14. Naib Z.: Effusions in exfoliative cytopathology. Little Brown and Company, Boston: 295 (1976).
15. Papanicolaou G.: Technique. Atlas of exfoliative cytology, Harvard University press, Cambridge: 3 (1954).
16. Platon D., Manager M., Adnet J.: Simultaneous high resolution of Ag-NOR proteins and nucleoproteins in interphasic and mitotic nuclei. J. Histochemical 16: 897 (1984).
17. Platon D., Manager M., Jeannesson P., Himber G., Pigeon, Adnet J.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. J. Histochemical 18:5 (1986).