

İNTRAKRANİYAL DEV HÜCRELİ TÜMÖRLERDE BİYOLOJİK İŞARETLEYİCİ OLARAK "NUCLEOLAR ORGANIZER REGION" (AgNOR)'IN KATKISI (PRELİMİNER ÇALIŞMA)

Dr. Aydın SAV (*), Dr. Özlem KURTKAYA (*), Stj. Dr. İlker KAYABEYOĞLU (**), Ecz. Gülsün EKİCİOĞLU (*), Dr. Mehmet ÖZEK (***), Dr. Necmettin PAMİR (***), Dr. Fahir ÖZER (***)

ÖZET: Son yıllarda hücre proliferasyonlarının doku işaretleyicileri beyin tümörlerinde prognostik indikatör olarak kullanılmaya başlanmıştır. Nucleolar organizier regions (NORs)'ın santral sinir sistemi tümörlerindeki katkısı halen tartışmalıdır. Bu çalışmada, 10 adet intrakraniyal dev hücreli nöroepitelyal tümör olgusunun parafin kesitlerine AgNOR tekniği uygulanarak nükleer AgNOR'lar işaretlendi. Bu olguların 6 tanesi glioblastoma multiforme-dev hücreli varyant, 2 tanesi subependimal dev hücreli astrositom, 1 tanesi pleomorfik ksantostrositom, 1 tanesi ise ganglioglioma idi. Çift kör olarak iki gözlemci tarafından dual mikroskopta işaretlenerek belirlenen aynı hücrelerin NOR'ları sayıldı. Toplam 100'er (küçük ve dev) hücre/olgu değerlendirildi. İstatistik olarak ortalama AgNOR/nukleus değerleri grupları ve gruplararası karşılaştırıldı. Bulunan sonuçlar nedeniyle, AgNOR gümüşleme yöntemiyle elde edilen numerik değerlerin intrakraniyal dev hücreli nöroepitelyal tümörlerin biyolojik davranışlarında kullanılabilecek bağımsız bir parametre olduğu konusu şüphe uyandırdı.

ANAHTAR KELİMELE: AgNOR, dev hücreli tümörler, intrakraniyal neoplazi.

SUMMARY: Tissue markers of cellular proliferation has been largely used as a prognostic marker lately. The role of AgNOR (Nucleolar Organizer Region) as a quantitative (numeric) marker has still been debated extensively in tumors of the central nervous system (CNS). In this particular study, NOR regions were stained on paraffin embedded and sectioned glass slides by silver impregnation in a group of 10 cases of intracranial giant cell neuroepithelial tumors. The study group consisted of six cases of glioblastoma, giant cell variant, two cases of subependymal giant cell astrocytoma, one case of pleomorphic xanthoastrocytoma and one case of ganglioglioma, respectively. Two independent observer counted individual glass slides of tumor cases applying double blind technique. Overall 100 cells/case of both neoplastic giant cells and neoplastic intervening small cells were evaluated. Mean and standard deviation of each particular cell type were calculated. Statistical analysis of the cell groups showed subtle differences but numeric values of each individual histologic subgroup was not interpreted to be an independent parameter that might be interrelated with the biologic malignancy potential of intracranial giant cell neuroepithelial tumors of the central nervous system.

KEY WORDS: AgNOR, giant cell tumors, intracranial neoplasia.

GİRİŞ

AgNOR yöntemi; ribozomal RNA (rRNA) sentezine kaynaklık eden, ribozomal DNA (rDNA) segmentlerinde yer alan, non-histon yapısındaki bazı proteinlerin (AgNOR proteinleri) gümüş ile siyah tanecikler halinde boyanarak, ince-

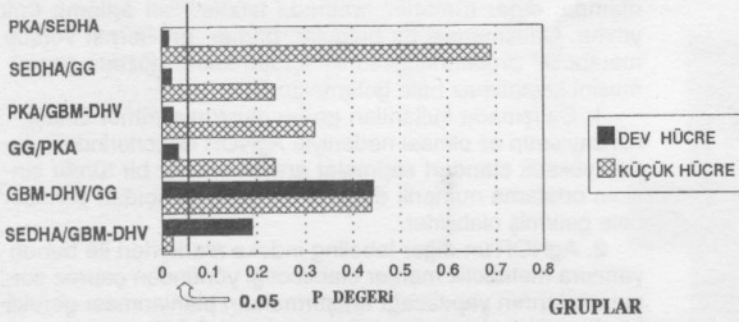
lenmesi yöntemidir (1,2,5-9). AgNOR taneciklerinin sayı ve dağılımının, rDNA gen segmentlerinin yapısal ve işlevsel özelliklerini yansıttığı düşünülmektedir (1,2,3). Bu görüşten hareketle, son yıllarda AgNOR yönteminin tümörle lezyonların prognostikasyonunda kullanılabilecek bir proliferatif indeks olması ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (1-5,8,9).

Bu çalışmada intrakraniyal dev hücreli nöroepitelyal tümörlerde biyolojik işaretleyici olarak AgNOR yönteminin katkısı araştırıldı.

* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D.

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem 4 öğrencisi

*** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji A.B.D.



GBM-DHV: Glioblastoma multiforme dev hücreli varyant, SEDHA: Subependimal dev hücreli astrositom, PKA: Pleomorfik ksantoastrositom GG: Ganglioglioma

GRAFİK 1. İntrakraniyal dev hücreli tümörlerde AgNOR değerleri

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal olarak, 1987-1992 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'na gelen intrakraniyal dev hücreli nöroepitelial tümörlerden (DHNET) 10 tanesi seçildi. Bu olgular glioblastoma multiforme, dev hücreli varyant GBM/DHV (n=6), subependimal dev hücreli astrositom SEDHA (n=2), pleomorfik ksantoastrositom PKA (n=1), ganglioglioma GG (n=1) idi.

Tüm olguların parafin kesitleri standart AgNOR yöntemi ile boyandı. Histolojik parametre olarak dev hücreler ve bunların arasındaki neoplastik küçük hücreler olmak üzere iki tip hücre seçildi.

İki gözlemci tarafından, çift kör olarak dual mikroskopta aynı tür hücrelerin Ag-NOR'ları, tüm Ag-NOR taneciklerinin tek tek sayıldığı Crocker tarafından benimsenen yöntem ile sayıldı (1). Her olgu için toplam 100'er hücre (Resim 1,2) değerlendirildi.

Her bir olgudaki küçük ve dev hücrelerin ortalama AgNOR/nukleus değerleri varyans analizi kullanılarak istatistiksel olarak bilgisayar ortamında karşılaştırıldı (9a). İstatistiksel çalışmalar grup içi ve gruplararası çapraz karşılaştırmalar şeklinde yapıldı.

BULGULAR

Olguların ortalama AgNOR/nukleus değerleri ve standart sapmaları:

GBM-DHV (dev hücre) = 6.03 ± 6.88 , (küçük hücre) = 2.22 ± 1.36 ;

SEDHA (dev hücre) = 5.0 ± 4.63 , (küçük hücre) = 1.90 ± 0.95 ;

GG (dev hücre) = 12.44 ± 9.78 , (küçük hücre) = 2.1 ± 1.55 olarak bulundu (Grafik 1).

Gruplararası istatistiksel karşılaştırmalar sonucu bulunan "p" değerleri ise: (Grafik 2)

1) Küçük hücreler için;

PKA - SEDHA	$\Rightarrow p = 0.66$
SEDHA - GG	$\Rightarrow p = 0.24$
PKA - GBM-DHV	$\Rightarrow p = 0.32$
GG - PKA	$\Rightarrow p = 0.24$
GBM-DHV - GG	$\Rightarrow p = 0.44$
SEDHA-GBM-DHV	$\Rightarrow p = 0.022$

2) Dev hücreler için;

PKA - SEDHA	$\Rightarrow p = 0.00000016$
SEDHA - GG	$\Rightarrow p = 0.000000022$
PKA - GBM-DHV	$\Rightarrow p = 0.000000025$

GG - PKA	$\Rightarrow p = 0.00000015$
GBM-DHV - GG	$\Rightarrow p = 0.435$
SEDHA - GBM-DHV	$\Rightarrow p = 0.175$

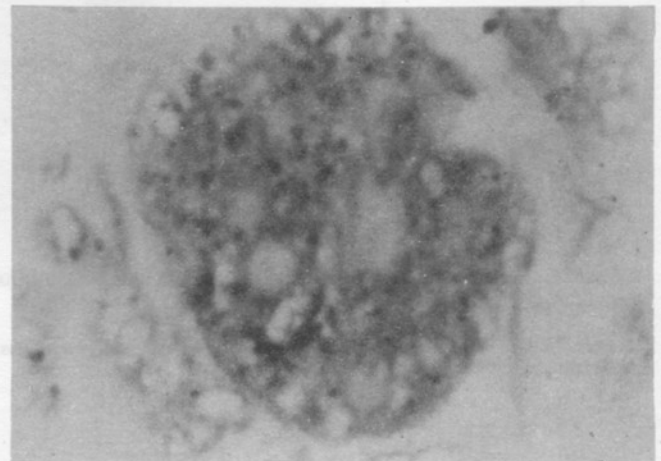
Sonuç olarak; küçük hücre baz olarak alındığında SEDHA/GBM-DHV grupları arasındaki istatistiksel anlamlı fark ($p < 0.05$) dışında, diğer gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Dev hücreler değerlendirildiğinde ise; GBM-DHV/SEDHA ve GBM-DHV/GG grupları hariç, istatistiksel anlamlı fark ($p < 0.05$) bulundu.

TARTIŞMA

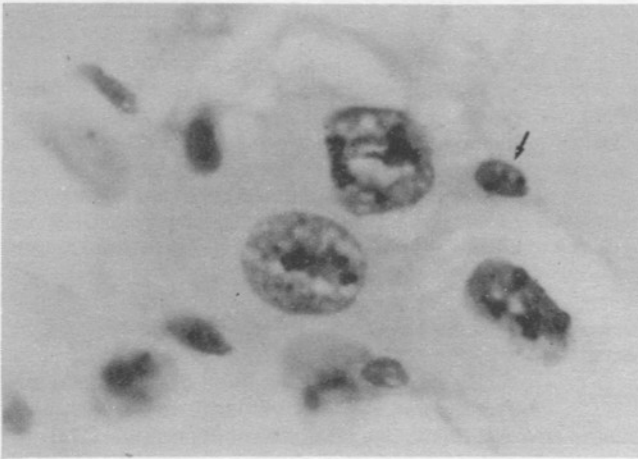
Bir proliferatif indeks olma özelliği halen tartışmalı olan AgNOR yönteminin bu çalışmada santral sinir sisteminin dev hücreli tümörlerinde (DHT) uygulanmasıyla bulunan sonuçlar oldukça şaşırtıcıdır (1-3,5,7-9). Santral sinir sisteminin dev hücreli tümörleri arasında histopatolojik olarak bir malign tümör (GBM-DHV) ile farklı histolojik ve klinik tablo gösteren, ancak benign karakterli üç ayrı tümör (GG, PKA, SEDHA) bulunmaktadır. Histopatolojik olarak, DHT'in H.E. boyasında ayırıcı tanısını yapmak zor olmaktadır. Bu nedenle, tümörlerin tanılarını koyarken tümörün yerleşim, klinik seyir, pre-, per- ve postoperatif görüntüleme detayları nöroşirürjiyenin gözlemleri gözönünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, immünohistokimya ve elektron mikroskopisi DHT'in ayırıcı tanılarında kolaylık sağlamaktadır.

Dev hücreli nöroepitelial tümörleri oluşturan iki farklı büyüklükteki tümör hücrelerinin tümörlerin biyolojik davranışlarındaki etki ve katkılarının araştırılması planlanarak yapılan bu çalışmada, nükleer organizör bölge işaretleyicilerinin kullanılması gerçekleştirildi. Bulgular dev hücre AgNOR6nukleus açısından değerlendirildiğinde iki benign DHT'de numerik olarak çok yüksek değerler saptanırken GBM-DHV'de dev hücre değerleri oldukça düşük bulundu.

GBM-DHV'de AgNOR büyük ve küçük hücre değerleri bile ortalama astrositom grade 2 ve 3 numerik değerlerinden büyüktür (7). Ancak, GBM gibi son derece malign olan bir tümörde gerek büyük ve gerek küçük hücre numerik değerlerinin benign DHT'lere oranla düşük çıkmasını açıklamak kullanılan tekniğin yalnızca bir proliferatif indeks işaretleyici-



Resim 1. Dev hücre (AgNOR, x1000)



Resim 2. Küçük hücre (AgNOR, x 1000)

cisi olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır. Dev hücreler gözönüne alındığında; AgNOR değerleri SEDHA-GBM-DHV ve GBM-DHV-GG arasında hiç fark olmadığını ortaya koyarken öte yandan da SEDHA ve PKA arasında istatistik olarak ileri derecede anlamlı farklılık bulunduğunu göstermektedir. Özellikle, GBM-DHV ve SEDHA'da dev hücre AgNOR numerik değerleri arasında farklılık bulunmaması, biyolojik olarak birbirine hiç benzemeyen iki farklı tümörde ortak özellik bulunmasını desteklemektedir.

Bu ortak özellik, ancak biri malign diğeri benign olan iki farklı tümörün dev hücrelerini metabolik olarak yaşatma gayreti içinde oldukları şeklinde formüle edilebilir. Yani, AgNOR noktalarının proliferatif indeks olmaktan çok metabolik bir marker olabileceği sorusunu güçlendirmektedir. Bu çalışmada yalnızca dev hücre numerik değerleri üzerinden bakıldığı zaman ortaya çıkan problematik AgNOR'un metabolik sorumluluğu üzerinde yoğunlaşırken, küçük hcreli neoplastik elemanların sorgulanmasında; SEDHA-GBM-DHV

dışında, diğer tümörler arasında istatistiksel anlamlı fark yoktur. Çalışmadaki bu bulgular, primer "proliferatif versus metabolik" problemiğinin iki açıdan tekrar gözden geçirilmesini kaçınılmaz hale getirmektedir.

1. Çalışmada kullanılan grubu oluşturan tümör cinslerinin sayısının az olması nedeniyle AgNOR değerlerinde bulunan yüksek standart sapmalar araştırılan her bir tümör cinsinin ortalama numerik değerlerini istatistik açıdan yanıltıcı hale getirmiş olabilirler.

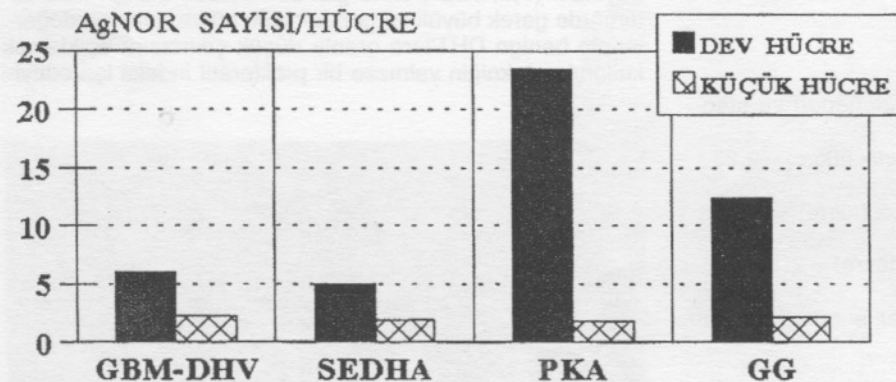
2. AgNOR'un diğer labeling indeks markerleri ile bunun yanısıra metabolik marker olabileceği yönünden çapraz sorgulamalarının yapılacağı araştırmaların planlanması gerekliliğini net bir şekilde ortaya koymuştur (1,2,6-9).

İkinci açıdan değerlendirildiğinde, NOR hakkında daha tanımlayıcı ve belirleyici olabilmek için, NOR ilişkili işlevlerin moleküler düzeyde B-23 ve C-23 bölge eşanlamlılıklarının test edilebilmesi in ya yüksek teknoloji ile moleküler düzeyde spesifik adrese yönelik sorgulama yapmak ya da hedef dokuları metabolik/proliferatif olarak birbirinden ayırarak AgNOR tekniğini uygulamak şeklinde yapılabilir (1,2,7-9).

Sonuçta, bu çalışma ile eld edilen AgNOR numerik değerleri, intrakraniyal dev hücreli nöroepitelyal tümörlerin biyolojik davranışlarının prognostikasyonunda kullanılabilecek bağımsız bir parametre olduğu konusunda şüphe uyandırdı.

KAYNAKLAR

1. Crocker J, Boldly DAR, Egan MJ: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol 158: 185-188, 1988.
2. Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trere D: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. American J Pathol Vol. 134, 4, April, 925,932, 1989.
3. Derenzini M, Pession A, Trere D: Quantity of Nucleolar Silver-Stained Proteins is related to proliferating activity in cancer cells. Lab Invest. 63: 1: 137, 1990.
4. Doğan Ö: AgNOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedenleri. The Turkish Journal of Pathology. 8: 2: 2,7, 1992.
5. 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.
6. Hough M, White B, Holden J: Relative tumorigenicities of hybrid cells with and without NSR-bearing chromosomes from a human melanoma cell line. Int. J. Cancer: 44: 360-366, 1989.
7. Maier H, Morimura T, Öfner D, et al.: Argyrophilic nucleolar region proteins (AgNORs) in human brain tumors: Relations with grade of malignancy and proliferation indices. Acta Neuropathol 80: 156-162, 1990.
8. Plate KH, Rüschoff J, Behnke J, Mennel H.D.: Proliferative potential of human brain tumors as assessed by nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67 immunoreactivity. Acta Neurochir (Wien), 104: 103-109, 1990.
9. Soomro IN, Whimster WF: Growth fraction in lung tumours determined by Ki67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. J Pathology, 162: 217-22, 1990.
- a) Statgraph, Laurel Ltd, 1987.
10. Suresh UR, Chawner L, Buckley CH, Fox H: Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue J Pathology, Vol. 160: 213-215, 1990.



GBM-DHV: Glioblastoma multiforme dev hücreli varyant, SEDHA: Subependimal dev hücreli astrositom, PKA: Pleomorfik ksantostrositom, GG: Ganglioglioma

GRAFİK 2. İntrakraniyal dev hücreli tümörlerde gruplararası istatistiksel verilerin karşılaştırılması