

Preoperatif kemoterapi uygulanan meme karsinomlu hastaların biyopsi ve mastektomi materyallerindeki AgNOR sayılarının karşılaştırılması*

Dr. Dilek BÜLBÜL** Dr. Kemal BAKIR** Dr. Servet ÇAMLIBEL**

ÖZET

AgNOR yönteminin benign ve malign lezyonların ayrımındaki değeri birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu yöntem aynı zamanda borderline ve malign lezyonların ayrımında da kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise tümörün kemoterapiye verdiği yanıtın takibinde AgNOR yönteminin deerinin araştırılması amaçlanmıştır. Lokal olarak ilerlemiş (T3b, T4) ve neoadjuvan kemoterapi grubuna alınan meme karsinomlu hastaların biyopsi ve mastektomi materyallerine AgNOR yöntemi uygulandı. Çalışmaya alınan 21 olgunun yaşları 27-65 arasında değişmektedir (ortalama 46.7). Olguların tamamı invaziv duktal karsinomdur. İki gözlemci tarafından biyopsi ve mastektomi materyallerindeki AgNOR sayıları birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. AgNOR sayıları açısından gözlemciler arasında anlamlı ilişki gözlemlendi ($p < 0,001$), ancak her iki gözlemcide de biyopsi ve mastektomi materyallerindeki AgNOR sayıları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Nucleolar Organizer Regions (NORs), hücre nükleolünde meydana gelen ve rRNA genlerine sahip DNA bölgesidir.^{1,2} Geliştirilen gümüşleme yöntemleri ile bu bölgeleri boyayarak, ışık mikroskobu ile gözlemlemek olanağı sağlanmıştır.³ AgNOR'un rDNA veya olası transkripsiyon düzeyinin göstergesi olabileceği kabul edilmekte ve hücrenin proliferatif aktivitesini yansıttığı ileri sürülmektedir.³ Bazı çalışmalarda NORs sayısı hücre ploidi ve Ki67 immün boyanması ile ilişkili görülürken, çoğu çalışmada hücre ploidisinden çok, hücre aktivitesini yansıttığı gözlenmektedir.^{4,5,6,7}

Lokal olarak ilerlemiş (T3b, T4), ancak uzak metastazi olmayan hastalarda lokal tedavi öncesi uygulanacak kombine kemoterapi programlarının sağ kalımı uzatması

SUMMARY

The value of AgNOR counts in differential diagnosis of benign and malignant lesions has been showed in many studies. This technique was also used in differential diagnosis of borderline and malignant lesions. The aim of this study is to reveal of the value of AgNOR counts in assessing of tumour response to chemotherapy. We studied AgNOR in biopsy and mastectomy materials of patients, with locally advanced breast carcinomas (T3b, T4), who received neoadjuvant chemotherapy. 21 cases were studied and the patients aged 27-65 (mean 46.7). All of the cases had invasive ductal carcinomas. The AgNOR counts in biopsy and mastectomy materials evaluated by two observers who were unaware of each others result. There was a significant relation between two observers ($p < 0,001$). However there was not significant difference between AgNOR counts of biopsy and mastectomy materials in the results of both observers ($p > 0,05$).

ve nükslerin önlenmesi açısından yararlı olduğu kabul edilmektedir.^{8,9}

Kemoterapiyi izleyen lokal tedavinin zamanı, bugün için klinikte gözlenen remisyon durumuna göre belirlenmektedir. Tümörün kemoterapiye verdiği cevapta daha objektif olan AgNOR yönteminin izlemeye yardımcı olup olamayacağını araştırmak amacı ile bu çalışma yapılmıştır. Aynı zamanda AgNOR sayımı açısından gözlemciler arası fark da araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

1988-1992 tarihleri arasında Ankara Onkoloji Hastanesinde neoadjuvan kemoterapi ve ardından radikal mastektomi uygulanan ve mastektomi materyalinde rezidüel tümörü bulunan 21 olgu çalışmaya dahil edildi. Olguların 18 tanesi tedavi öncesi klinik evre IIIB, 3 tanesi

* X. Ulusal Patoloji Kongresinde Poster Olarak Sunulmuştur.

** Ankara Onkoloji Hastanesi Patoloji Bölümü

Tablo I: Kemoterapi öncesi ve sonrası ortalama AgNOR değerleri

I. GÖZLEMCI			II. GÖZLEMCI		
OLGU	BIYOPSİ	REZİDÜEL TM.	OLGU	BIYOPSİ	REZİDÜEL TM.
1	5.37	3.75	1	4.64	3.25
2	1.65	2.06	2	1.86	2.92
3	2.73	1.42	3	2.45	1.72
4	2.11	2.75	4	1.92	2.07
5	3.80	1.92	5	2.67	1.83
6	4.56	3.60	6	4.00	2.36
7	3.60	3.46	7	2.95	1.92
8	2.57	4.01	8	2.10	3.87
9	1.53	2.93	9	1.31	2.71
10	2.50	3.35	10	2.09	2.42
11	3.06	2.55	11	2.09	2.42
12	7.90	2.02	12	5.08	1.70
13	2.43	1.94	13	3.65	1.92
14	3.16	2.79	14	4.01	3.03
15	3.04	2.06	15	2.60	1.84
16	3.73	3.48	16	1.73	2.53
17	3.60	3.20	17	3.52	2.13
18	4.09	2.38	18	2.72	1.84
19	3.65	2.86	19	3.83	1.70
20	3.66	2.87	20	5.27	2.82
21	1.96	3.18	21	1.60	2.58
ORT.	3.36	2.78		3.01	2.53

klirik evre IIIA idi. 14 olguya CMF, 7 olguya FAC tedavisi uygulandı. Kemoterapi süreleri klinik cevaba göre belirlenen olgulara parsiyel remisyonu izleyen 3-4 hafta içinde radikal mastektomi uygulandı.

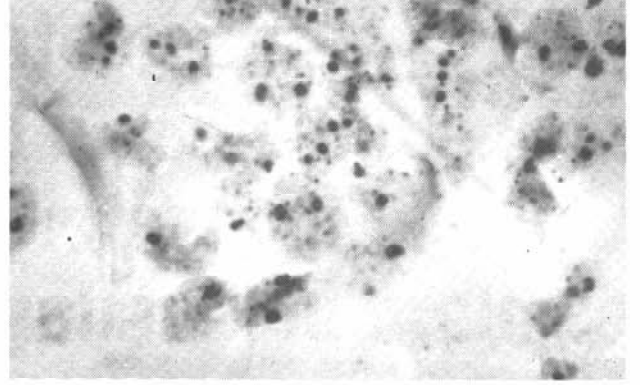
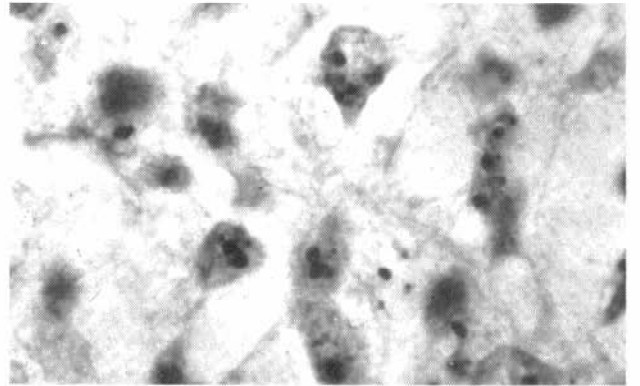
Tedavi öncesi biyopsi materyalleri ve mastektomi materyallerine %10 formalinde fiksasyondan sonra parafin takibi uygulandı. H.E. boyalı preparatlardan tümörlü bloklar seçilerek 4 mikron kalınlığında boyasız kesitler hazırlandı. Bu kesitlere Crocker ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle AgNOR boyama yöntemi uygulandı. AgNOR boyama yöntemi çalışma solüsyonu için gerekli olan iki ayrı çözelti hazırlandı:

1. 100ml deiyonize suya 1g/dl olacak şekilde formik asid eklendi ve buna 2g jelatin katılarak manyetik karıştırıcıda 15 dakika kadar ısıtılıp karıştırıldı.

2. Deiyonize su ile 50g/dl olacak şekilde gümüş nitrat çözeltisi hazırlandı.

Jelatinli solüsyondan 1 volüm, gümüş nitrat solüsyonundan 2 volüm alınıp karıştırılarak çalışma solüsyonu elde edildi.

İki ayrı gözlemci tarafından birbirinden bağımsız olarak ve x100 immersiyon objektifi kullanılarak rastgele 100 hücrede, Howat ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle

**Resim 1:** Kemoterapi öncesi AgNOR benekleri (X1000).**Resim 2:** Kemoterapi sonrası AgNOR benekleri (X1000).

NOR benekleri ayrıldı.^{10,11}

Sonuçlar korelasyon analizi, eşleştirilmiş t testi ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

SONUÇLAR

21 hastanın yaşları 27-65 (ortalama 46,7) arasında idi. Klinik cevaba göre 14 olguya 2-6 kür CMF, 7 olguya da 1-3 kür FAC tedavisinden sonra radikal mastektomi uygulandı. Bu çalışma grubu histopatolojik olarak invaziv duktal karsinom tanısı alan olgulardan oluşturuldu. Kemoterapi öncesi ve sonrası tümör dokuları arasında histopatolojik açıdan önemli bir fark gözlenmedi.

Her olgu için iki ayrı gözlemci tarafından saptanan ortalama AgNOR sayıları Tablo I'de gösterilmiştir.

Gözlemciler arasında sayısal değerler açısından biyopsilerde %11,57, mastektomilerde %11,48 oranında fark olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p < 0,001$).

Her iki gözlemcinin biyopsi ve mastektomi materyallerindeki ortalama AgNOR sayıları karşılaştırıldığında biyopsilerdeki ortalama AgNOR sayısı daha düşük olmakla birlikte, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Olgu sayılarının az olmasına rağmen CMF ve FAC grupları ortalama AgNOR sayılara açısından karşılaştırıl-

mış, ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Histopatolojide tümörlerin proliferatif potansiyellerinin değerlendirilmesi prognozun belirlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla DNA flow cytometry, Ki67 immün boyanma yöntemi, Thimidin up-take çalışmaları gibi birçok komplike yöntem kullanılabilmektedir. Birçok çalışmada bu yöntemler ile AgNOR yöntemi karşılaştırılmış ve birbirine yakın sonuçlar bulunmuştur.³ Diğer yöntemlerin güç ve pahalı olması nedeniyle AgNOR yöntemi daha geniş uygulama alanı bulmuştur. Kolay ve ucuz bir yöntem oluşuna karşın çoğu boyama ve sayma işlemine ait bazı dezavantajları da vardır. Ancak yine de tekrarlanabilirliği olan bir yöntemdir. Bu çalışmada iki ayrı gözlemcinin sayısal değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin saptanması da bunun göstergesidir.

Daha önce yapılan birçok çalışmada benign ve malign lezyonlar arasında AgNOR sayıları açısından anlamlı

farklar olduğu saptanmıştır.^{12,13,14} Ancak malign lezyonlarda, çeşitli etkiler altında, zaman içinde AgNOR sayıları açısından değerlendirmenin yapıldığı çalışmalar sınırlıdır.

Bogomoletz ve arkadaşlarının bizim çalışmamızdaki-ne benzer olarak 11 meme karsinomunda yaptıkları çalışmada kemoterapi öncesi ve sonrası materyallerdeki ortalama AgNOR sayıları anlamlı olarak farklı bulunmuştur.¹⁵ Çalışmamızda bu anlamlı farklılığı saptayamadık. Her iki çalışma grubu da az sayıda olgudan oluşmaktadır. Bu nedenle, bu konuda daha kesin yorumların yapılabilmesi için geniş serilerin incelenmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Sunulan çalışma bir ön çalışma olarak yapılmıştır. Preoperatif kemoterapi uygulanan hastalarda, kemoterapi kürleri arasında alınan tru-cut biyopsi materyallerinde AgNOR yöntemi uygulanarak, sayısal değerlerin karşılaştırılması amacı ile bir çalışma yürütülmektedir. Bu çalışma daha geniş bir seriyi kapsaması ve tedavi etkisini değerlendirmede AgNOR'un rolü olup olamayacağının belirlenmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- 1 Goodpasture C., et al: Visualization of NORs in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37-50; 1975.
- 2 Howell W.M., et al: Controlled silver-staining of NORs with a protective colloidal developer; a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014; 1980.
- 3 Walker R.A.: Commentary: The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology*, 12:221-223; 1988.
- 4 Boldy D.A.R., Crocker J., Ayres J.G.: Technical method: Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. *J Pathol*, 157: 75-79; 1989.
- 5 Crocker J., Nar P.: NORs in lymphomas. *J Pathol*, 151: 111-118; 1987.
- 6 Egan M.J., Crocker J.: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J. Pathol*, 154: 247-253; 1988.
- 7 Leong A.S.Y., et al: Silver staining of NOR in malignant melanoma and melanotic nevi. *Human Pathology*, 20:3: 257-262; 1989.
- 8 Swain S.M., et al: Neoadjuvant chemotherapy in the combined modality approach of locally advanced nonmetastatic breast cancer. *Cancer Research*, 47: 3889-3894; 1987.
- 9 Kantarjian H.M., et al: The management of locally advanced breast cancer: a combined modality approach. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20: 1353-1361; 1984.
- 10 Crocker J., Boldy D.A.R., Egan M.J.: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol*, 158: 185-188; 1989.
- 11 Howat A.J., et al: NORs in spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer*, 63: 474-478; 1989.
- 12 Bakır K.: AgNOR yönteminin, benign ve malign melanositik lezyonların ayırıcı tanısındaki yeri ve değeri. *Acta Oncologica Turcica*, 23: 129-138; 1990.
- 13 Bakır K., Sağlıcan Y., Kutluay L., Pak I.: Epidermoid karsinom, keratoakantom ve psödoepitelyomatöz hiperplazi'de AgNOR yöntemi. *Acta Oncologica Turcica*, 23: 108-114; 1990.
- 14 Raymond W.A., Leong A.S.Y.: NORs relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol*, 20: 741-746; 1989.
- 15 Bogomoletz W.V., Pourny C., Didier B.: Argyrophilic nuclear organizer region counts in locally advanced breast carcinoma treated by chemotherapy before surgery. *The Eur J Cancer*, 26: 1042-1044; 1990.