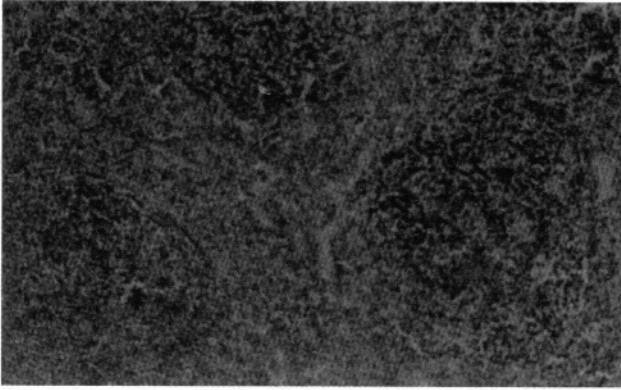


Foilkult PCNA Im

Dr. Semin Ayhan*

ÖZET

10



Resim 1 : Nodüler boyanma patterni gösteren bir FL olgusu (Anti-bcl-2, x100).

monoklonal anti-PC10 (DAKO, Danimarka) ile otuz dakika inkübe edilmiştir. Primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, tüm kesitlere streptavidin-biotin yöntemi (LSAB-2 Kit, DAKO, Danimarka) ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Kromojen olarak new-fuksin-substrate (DAKO, Danimarka) kullanılmıştır. Uygulama sırasındaki tüm inkübasyonlar oda ısısında, nemli ve kapalı bir ortamda yapılmıştır. İnkübasyonlar arasındaki tüm yıkamalarda TBS (pH 7.6, 0.05 M) kullanılmıştır. Anti-PCNA ve anti-bcl-2 monoklonal antikorları ile yapılan boyamalarda, her dokudan hazırlanan yedek kesitlere monoklonal antikor yerine negatif kontrol olarak DAKO firmasından sağlanan negatif kontrol solüsyonu (non-immune serum) uygulanmıştır. PCNA boyamasında pozitif kontrol,

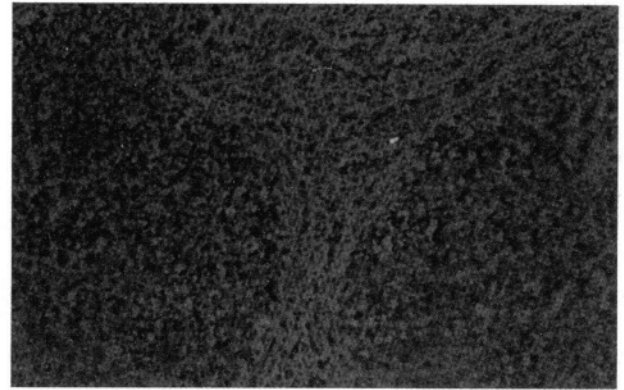
Tablo 1: Bcl-2 pozitif FL olgularında histolojik altgruplara göre bcl-2 boyanma patterni

Boyanma Patterni	KÇHFL	MHFL	BHFL	Toplam
Pozitif, Nodüler	13	2	1	16
Pozitif, Diffüz	2	2	0	4
Pozitif, Diffüz+Nodüler	4	-	5	9
Toplam	19	4	6	29

Tablo 1: Çalışmamızda elde edilen PCNA ve AgNOR değerleri

	%		SD		SEM	
	PCNA	AgNOR	PCNA	AgNOR	PCNA	Agnor
KÇHFL	10.56	2.96	3.92	0.59	0.95	0.15
MHFL	11.60	3.74	2.62	0.07	1.51	0.04
BHFL	18.04	4.31	3.08	0.41	0.97	0.13

SD: Standart Sapma, SEM: Standart Hata



Resim 2: İnterfolliküler bölgede de boyanmanın izlendiği diffüz+nodüler boyanma patterni (Anti-bcl,2 x100)

PCNA ile boyanması önceden saptanmış ve indeksi çıkarılmış olan kolon adenokarsinomu tanısı almış bir olgunun doku kistleri kullanılmıştır. Anti-bcl-2 ile boyamada bir reaktif folliküler hiperplazi olgusu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

AgNOR boyamada ise kesitler 3:1 etanol/asetik asit karışımında 10 dakika bekletilip postfikse edildikten sonra rehidrate edilmiştir. Çalışma solüsyonu 1 kısım % 50'lik gümüş nitrat solüsyonu, 1 kısım %1'lik formik asitte % 2 oranında çözülmüş jelatin ve 1 kısım distile su karışımından elde edilmiştir. Kesitler bu solüsyonda, oda ısısında ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiştir.

Değerlendirme körleme olarak olguların histopatolojik tanıları bilinmeksizin yapılmıştır. Bcl-2 değerlendirmesinde follikül içinde ve interfolliküler alanda boyanma gösteren olgular pozitif, follikül için boyanma göstermeyen olgular negatif olarak kabul edilmiştir. Histopatolojik altgruplarda bcl-2 boyanma oranları ve boyanma patternleri incelenmiştir. PCNA değerlendirmesi ve PCNA boyanmasının sayımı standart ışık mikroskobunda x40 objektif ile yapılmıştır. Doku kesitlerinde toplam 10 alanda rastgele seçilen 1000 hücre sayılmıştır. PCNA boyanma indeksi, nükleuslarda diffüz ya da granüler boyanma gösteren pozitif hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. AgNOR sayımı ise x100 objektif ile 100 hücre sayılarak yapılmıştır. Sayımda Crocker ve arkadaşlarının

önerdiği şekilde nükleus içinde yeralan nükleoler ve ektranükleoler AgNOR benekleri sayılmıştır.

BULGULAR

FL olgularının yaşları 31-74 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 53.96 olarak belirlenmiştir. Olguların büyük bir bölümü (% 84.8) 5-7. dekatlar arasında yer almaktadır. Cinsiyet yönünden incelendiğinde kadın: erkek oranı 1:1.3 olarak belirlenmiştir.

Klinik izleme ait veriler yalnızca 14 FL olgusunda elde edilebilmiştir. Bu olguların % 85.7'si tanı sırasında III. ya da IV evrededir. Ayrıca % 35.7'sinde kemik iliği tutulumu, % 64.2'sinde ektranodal tutulum izlenmiştir. Ektranodal tutulum yerleri kemik iliği dışında karaciğer, dalak, pankreas, çekum, prostat ve plevradır. Olgulara klasik CHOP kombinasyonu ile sağaltım uygulanmış ve % 63.6'sında remisyon sağlanmıştır. Bu olguların klinik izlemleri halen devam etmektedir.

FL olgularında incelenen lenf nodu materyalleri arasında en sık servikal (% 33.3) ve inguinal (% 24.2) lenf nodu örnekleri izlenmiştir. Bunun yanı sıra aksiller, supraklaviküler, intraabdominal, retroperitoneal, paraaortik, submandibuler lenf nodları da incelemeye alınan örnekler arasında yer almaktadır.

FL olguları histopatolojik altgruplar yönünden tekrar incelenmiş, WF sınıflandırmasına göre 19 olgu (% 57.5) küçük çen-

tikli hücreli FL (KÇHFL), 10 olgu (% 30.3) büyük hücreli FL (BHFL), 4 olgu da (% 12.1) mikst hücreli FL (MHFL) olarak değerlendirilmiştir.

Bcl-2 immunreaktivitesi yönünden incelendiğinde olguların % 87.8'i bcl-2 pozitif, % 12.2'si bcl-2 negatif olarak saptanmıştır. Histopatolojik altgruplara göre değerlendirildiğinde şu veriler elde edilmiştir.

- İncelenen 19 KHFL olgusunun tümü bcl-2 pozitifdir.
- İncelenen 4 MHFL olgusunun tümü bcl-2 pozitifdir.
- İncelenen 10 BHFL olgusunun 6'sı bcl-2 pozitif iken 4'ü bcl-2 negatiftir.

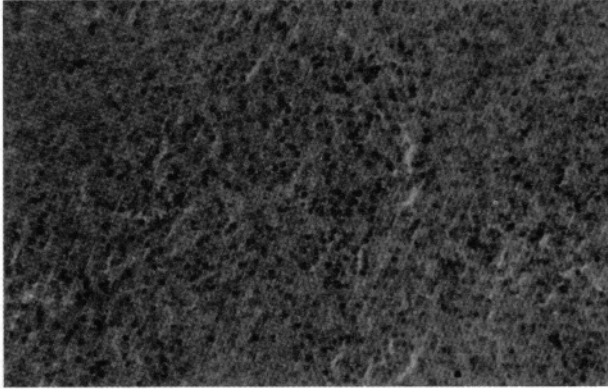
Bu bulguların istatistiksel değerlendirmesinde BHFL'nin diğer histolojik altgruplara göre anlamlı ölçüde daha sık negatif boyandığı ($p < 0.01$), KÇHFL'nin ise anlamlı ölçüde daha sık pozitif boyandığı gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Bcl-2 pozitif olgularda histopatolojik altgruplarda izlenen boyanma patternleri nodüler, diffüz ve diffüz+nodüler olarak izlenmiştir. Nodüler boyanmada tüm neoplastik folliküller yoğun bir boyanma gösterirken interfolliküler alanlarda çok az sayıda pozitif hücre dikkati çekmiştir (resim 1). Diffüz boyanmada interfolliküler bölgedeki yoğun boyanma nedeniyle neoplastik folliküller seçilememektedir. Diffüz+nodüler boyanmada ise interfolliküler bölgede boyanma olmasına karşın neoplastik folliküller belirgin boyanma özelliğini korumaktadır (resim 2). Boyanma patternleri çalışmamızda incelendiğinde nodüler boyanma % 55.17, diffüz boyanma % 13.8, diffüz+nodüler boyanma ise % 31.03 olarak saptanmıştır (Tablo-1). Çalışmamızdaki olgular bu boyanma patternlerine göre değerlendirildiğinde KÇHFL'nin diğer histopatolojik altgruplara göre belirgin şekilde nodüler boyanma patterni gösterdiği dikkati çekmiştir.

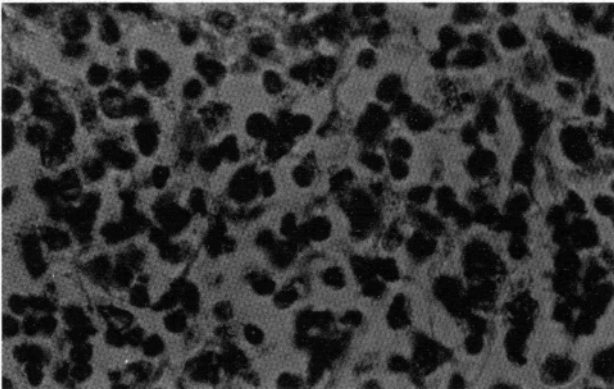
FL olgularında histopatolojik altgruplara göre PCNA ve AgNOR değerleri tablo-II'de gösterilmiştir. PCNA immunreaktivitesinde, FL altgrupları arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). AgNOR değerleri yönünden kıyaslandığında da histolojik altgruplar arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.001$). Her iki belirleyici ile en düşük değerler KÇHFL grubunda, en yüksek değerler ise BHFL grubunda izlenmiştir (resim 3,4).

TARTIŞMA

Çalışma grubumuzdaki FL olgularının tümü erişkin yaş grubundadır ve erkek: kadın oranı yaklaşık olarak eşittir. Bu bulgular hastalığın genel özellikleri ile uyumludur. Klinik verileri elde edilebilen olgular (14/33) değerlendirildiğinde tanı sırasında olguların büyük kısmının ileri evrede olduğu görülmektedir. Bu bulgunun literatür bulguları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (4). Olgularımızda tanı sırasındaki kemik iliği tutulumu % 35.7 olarak belirlenmiştir. İncelenen yayınlarda ise FL'larda kemik iliği tutulumu % 80'lere ulaşan seriler bulunmaktadır (5). Çalışma grubumuzda kemik iliği tutulumunun düşük olması klinik verilerin yetersizliği ile açıklanabilir. Literatürde primer tutulum yeri olarak sıklıkla servikal ve inguinal lenf nodları bildirilmiştir (6). Çalışmamızda, klinik veri sağlanabilen olgularda değişik



Resim 3 : PCNA indeksi yüksek bir BHFL olgusu (Anti-PCNA, x200).



Resim 4 : Bir KÇHFL olgusunda düşük AgNOR skoru (AgNOR boyası, x1000).

Tablo 3 : Değişik serilerde histolojik alt gruplara ilişkin bcl-2 boyanma oranları.

Araştırmacı	Toplam FL Olguları n	%	KÇHFL (%)	MHFL (%)	BHFL (%)
Gaulard (3)	119/140	85	100	86	76
Pezzella (7)	55/64	70.3	94	92.5	45
Utz(1)	41/46	89	100	-	81.8
Ayhan	29/33	87.8	100	100	60

Tablo 4 : Çalışma sonuçlarının Zutter'in serisiyle kıyaslanması

Araştırmacı	KÇHFL (%)		MHFL (%)		BHFL (%)	
	Zuttler	Ayhan	Zuttler	Ayhan	Zuttler	Ayhan
Gaulard (3)	71.4	68.4	20.0	50.0	50.0	17.0
Pezzella (7)	14.2	10.5	20.0	50.0	0.0	0.0
Utz(1)						
Ayhan	14.2	21.05	60.0	0.0	50.0	50.0

Tablo 5 : Çalışmamızdaki PCNA indeksinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması

Araştırmacı	KÇHFL (%)	MHFL (%)	BHFL (%)
Sebo (10)	6.94+1.9	12.2+3.1	19.8+1.8
Korkolopoulou(11)	25	18	44
Ayhan	10.77	12.37	18.04

odaklarda, multipl lenfadenopati bulunduğundan primer tutulum yeri hakkında kesin bir bilgi elde edilememiştir. Buna karşın tüm çalışma grubunda en sık incelemeye alınan lenf nodları servikal ve inguinal lenf nodları olmuştur. Klinik bulgular-klasik literatür bulguları ile uyumlu olmasına karşın klinik izlem olgularının tümünde elde edilemediği için histopatolojik korelasyonu yapılamamıştır.

FL olgularında bcl-2 pozitifliği histolojik alt gruplara göre değerlendirildiğinde alt gruplarda bcl-2 boyanma oranlarının değiştiği dikkati çekmektedir. Utz, Gaulard ve Pezzella'nın serileri ile bizim serimiz birlikte değerlendirildiğinde tümünde KÇHFL grubunda yeralan olgularda en yüksek BHFL grubunda ise en düşük boyanma oranı elde edilmiştir (tablo-III) (1,3,5,7).

Bu bulgu istatistiksel olarak incelendiğinde BHFL'nin diğer alt gruplara göre anlamlı ölçüde daha sık negatif boyandığı ($p<0.01$), KÇHFL'nin ise anlamlı ölçüde daha sık pozitif boyandığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Pezzella ve arkadaşları ile çalıştıkları seride FL olgularında iki farklı boyanma patterni elde etmişlerdir, nodüler ve diffüz (8). Gaulard ve arkadaşlarının çalışmasında da nodüler ve diffüz boyanma patternleri görülmüştür (3). Bcl-2 onkoproteini ile farklı hematopoetik tümörlerde araştırma yapan Zutter ve arkadaşları bcl-2 pozitif FL olgularında üç farklı boyanma patterni tanımlamışlardır (9). Nodüler ve diffüz boyanma patternleri dışında, diffüz boyanma olduğu halde neoplazistik folliküllerin daha yoğun ve belirgin boyandığı grup "diffüz+nodüler" pattern olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızdaki olgular bu yaklaşım ile değerlendirildiğinde Tablo 1'deki sonuçlar elde edilmiştir. Zutter'in çalışması ile karşılaştırıldığında en büyük korelasyonun olguların çoğunluğunu oluşturan KÇHFL'da olduğu dikkati çekmiştir (tablo 4).

Sebo, NHL çalışma grubundaki olgulardan FL tanısı alan 18 olguyu, Korkolopoulou ise serisindeki 37 FL olgusunu ayrıca değerlendirmişlerdir (10,11). Bu serilerdeki histolojik alt gruplarda PCNA değerleri tablo-4'de görülmektedir. Bu tabloya bizim çalışmamızdaki FL olgularının PCNA değerleri de eklenmiştir. Çalışmamızda elde edilen PCNA indeksleri özellikle Sebo ve arkadaşlarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Her iki seride de, KÇHFL ve MHFL olgularında birbirini yakın PCNA indeksleri izlenirken BHFL'da PCNA indeksi belirgin şekilde daha yüksek. KÇHFL ve MHFL'nin düşük dereceli NHL grubunda, BHFL'nin ise orta dereceli NHL grubunda yer aldığı düşünüldüğünde PCNA indeksinin prognostik açıdan histolojik alt gruplarla uyum içinde olduğu görülmektedir.

Korkolopoulou, çalışmasındaki FL olgularında AgNOR yöntemini de uygulamış ve KÇHFL'da 1.93, MHFL'da 2.20, BHFL'da ise 2.58 değerlerini elde etmiştir (11). Bu değerler bizim elde ettiğimiz değerler ile uyumludur. Düşük dereceli NHL grubunda çalışan Smith ve Boldy ise AgNOR skorunu sırasıyla 5.4 ve 1.16 olarak değerlendirmişlerdir (12,13).

Çalışmamızda histolojik kriterlere göre üç alt gruba ayırdığımız FL olgularının ortalama PCNA ve AgNOR değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. FL'lar düşük dereceli Non-Hodgkin Lenfoma grubunda yer aldıkları için elde edilen değerlerin düşük olması beklenen bir bulgudur. Ancak FL'nin alt gruplarında proliferasyon kapasitesi yönünden izlenen farklar da anlamlıdır. Bu yönüyle PCNA ve AgNOR'un prognostik bir belirleyici olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Utz GL, Swerdlow SH. Distinction of follicular hyperplasia from follicular lymphoma in B5 -fixed tissues: Comparison of MT2 and bcl-2 antibodies. *Hum Pathol* 1993;24: 1155-1158.
2. Swerdlow SH, Westermann CD, Pelstring RJ, Saboorian MH, Williams ME. Growth fraction in centrocytic and follicular center cell lymphomas. *Hum Pathol* 1993; 24: 540-546.
3. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992;140: 1089-1095.
4. Harris NL, Ferry JA: Follicular lymphoma and related disorders (germinal center lymphomas). In *Neoplastic Hematopathology* (Ed: Knowles) DM, Baltimore, Williams&Wilkins, 1992; 645-674.
5. Criel A, Pittaluga S, Verhoef G, Wlodarska I, Meeus P, Mecucci C et al: Small B cell NHL and their counterpart: differences in subtyping and assessment of leukemic spread. *Leukemia* 1996; 10: 848-853.
6. Come SE, Jaffe ES, Andersen JC: Non-Hodgkin's lymphomas in leukemic Clinicopathologic correlations. *Am J Med* 1980;53: 1109-1114.
7. Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersboll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14; 18 chromosomal translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1992;65: 87-89.
8. Pezzella F, Tse AGD, Cordelle JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990;137: 225-232.
9. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991;78: 1062-1068.
10. Sebo TJ, Roche PC, Witzig TE, Kurtin PJ: Proliferative activity in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol*; 99: 668-672.
11. Korkolopoulou P, Patsouris E, Pangalis G, Tsenga A, Elemenoglou J, Tsangli ET et al. A comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen, c-myc, p53 and nucleolar organizer region staining in non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 1993;24: 371-377.
12. Smith FG, Murray PG, Crocker J. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 1993; 46: 28-31.
13. Boldy DAR, Crocker J, Ayres JG. Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. *J Pathol* 1989; 157: 75-79.