

Gastrointestinal Sistemin Düz Kas Tümörlerinde PCNA Ekspresyonu ve AgNor Skoru

Dr. Gökhan Gedikoğlu* Dr. Şükrü O. Özdamar** Dr. Levent Yıldız**
Dr. Beyhan Demirhan***

ÖZET

Gastrointestinal düz kas tümörlerinin biyolojik davranışlarını belirlemede konvansiyonel olarak mitoz miktarı, sellülarite, nükleer pleomorfizm, nekroz varlığı morfolojik parametreler olarak kullanılmaktadır. Günümüzde bunlara ek olarak tümör proliferasyon indeksleri de değişik belirleyicilerle değerlendirilmektedir. Bu amaçla; 23 olgu hem klinik verileri açısından, hem de mitotik sayımları, PCNA ekspresyonu ve AgNOR skorları açısından incelenmiş ve istatistiksel yorumu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gastrointestinal sistem, düz kas neoplazmları, AgNOR, PCNA

GİRİŞ

Gastrointestinal düz kas tümörlerinin biyolojik davranışını sadece morfolojik parametrelerle belirleyebilmek çok zordur. Bu amaçla değerlendirmede kullanılan tümörün boyutu, mitoz miktarı, sellülarite, nükleer pleomorfizm, hücre şekli (iğsi/yuvarlak) ve nekroz varlığı gibi veriler önemli prognostik kriterler olmakla beraber oldukça subjektiftir ve bazıları intra/inter gözlemciler arası farklı değerlendirmelere neden olabilmektedir.

Son yıllarda; tümörlerin biyolojik davranışlarını belirleyebilmek amacı ile tümör proliferasyon indeksleri (TPI) saptanmaya çalışılmaktadır.

AgNOR yöntemi ribozomal RNA sentezine kaynaklık eden ribozomal DNA segmentlerinde yer alan non-histon yapısındaki bazı nükleolar asidik fosfoproteinlerin (AgNOR proteinleri) gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopunda incelenmesini sağlar. Bu yapıların sayı ve dağılımı bu proteinlerin, dolayısıyla da rDNA gen segmentlerinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini yansıtır. Bu temel özellikten hareket edilerek metabolik ve proliferatif aktivite farklılıkları gösteren hücreler arasında AgNOR sayı ve dağılımı farklı bulunur. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada diagnostik ve prognostik

SUMMARY

Gastrointestinal smooth muscle tumors are lesions in which it is difficult to predict clinical outcome from the histological appearances. Twenty three cases were studied using three different methods of assessing aspect of cellular proliferation; these were a) mitotic counts b) interphase nucleolar organizer region staining (AgNORs) and c) immunostaining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Key words: Gastrointestinal system, smooth muscle neoplasm, AgNOR, PCNA

açından tümöral lezyonların değerlendirilmesinde yararlı bir proliferasyon indeksi olabileceği ileri sürülmektedir.

Hücre siklusunda geç G1-erken S evresinde nükleuslarda eksprese olan ve hücrede DNA proliferasyonunun başlamasında rol oynayan DNA polimeraz-teta yardımcı proteini olan "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA/Cyclin, 36kd, p10) pozitifliğinin gösterilmesi de çeşitli proliferatif lezyonlarda proliferasyon indeksi olarak kabul edilmeye başlanmıştır. PDGF (Platelet derived growth factor) gibi bazı büyüme faktörleri de PCNA ekspresyonunu belirginleştirmektedir.

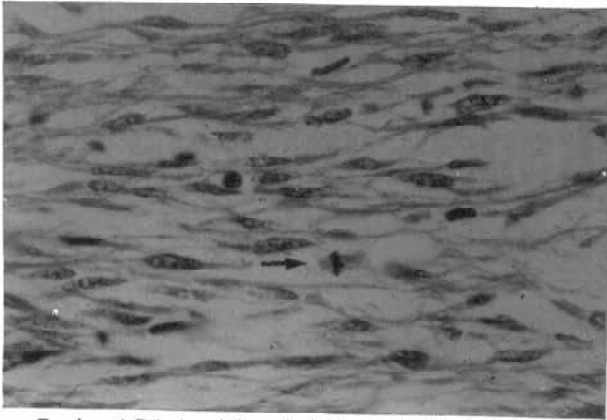
Biz de bu amaçla serimizde PCNA ekspresyonu ve AgNOR skorlarını araştırdık ve bu belirleyicilerin tümörün biyolojik davranışı üzerindeki olası rolünü ve prognozla olan ilişkisini inceledik.

GEREK VE YÖNTEM

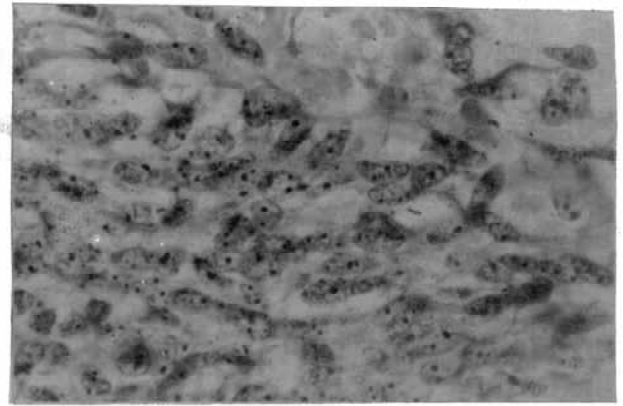
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan 23 hasta vaka grubumuzu oluşturmaktadır. Bu hastalara ait tüm preparatlar ışık mikroskopik olarak değerlendirildikten sonra, bir parafin blok immünohistokimya ve standart AgNOR boyama yöntemi için seçilmiştir.

Vakalarda histolojik "grading" yaparken 10 Büyük Büyütme Alanında (BBA) 4 veya daha az mitoz olanlar be-ning, 5 veya daha fazla mitoz/10 BBA olanlar malign olarak değerlendirilmiştir (Mitotik indeks: Mİ; Olympus BH2 mikroskop, x10 okuler, x40 objektif). Epiteloid görünümde hücrelere

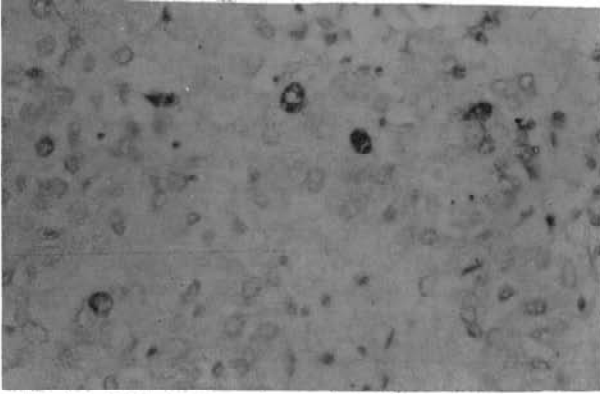
* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
*** Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı



Resim: 1 Düz kas hücrelerindeki mitotik aktivite (okla işaretli), H+E (x460)



Resim: 2 Tümör hücreleri nükleuslarında AgNOR benekleri (Colloidal gümüş, x1000, imm. Oil)



Resim: 3 Düz kas neoplazmında PCNA pozitif hücreler, streptavidin-biotin peroksidaz (x460)

sahip leiomyoblastomlar da yine bu değerlendirmeye tabii tutulmuştur.

PCNA (Clone P10, Zymed, USA), seçilen bloklara Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi ile uygulanmıştır ve PCNA indeksi (PI) şu formülle belirlenmiştir. PI = Nükleer pozitivite gösteren hücreler / 1000 neoplastik hücre.

AgNOR (interphase nucleolar organizer region) için koloidal gümüş boyama metodu uygulanmıştır. Deparafinize edilen kesitler gelatin/formik asit-gümüş nitrat solusyonu ile karanlıkta 1 saat muamele edilmiştir. AgNOR skoru (AS); her vaka da 100 tümör hücresi nükleusunda AgNOR benekleri sayılarak, nükleus başına düşen ortalama değer alınarak hesaplanmıştır (x1000, imm oil).

Olgular önce mitoz sayımına göre (4 veya daha az mitoz olanlar ve 5 ve daha fazla mitoz olanlar/ 10 BBA) iki gruba ayrıldıktan sonra, bu gruplar arasında tümör çapı (TÇ), PI ve AS arasında anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla grupların ortalama değerleri, standart sapmaları hesaplanmış ve Student-t testi ile "Pearson correlation matrix (PCM)" uygulanmıştır. P; 0,05'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi arşivinde hastaların dosyalarından takip olup olmadıkları, izlem süreleri, radyoterapi veya kemoterapi görüp görmedikleri araştırılmıştır.

Tablo-I: Düz kas neoplazmlarında, ortalama tümör çapları (TÇ), AgNOR skorları (AS) ve PCNA indeksleri (PI)

	TÇ (cm)	AS	PI
Leiomyom	6,9	3,147	26,4
Leiomyosarkom	10,1	5,279	52,7
p değeri	0,09	0,09	0,03

Tablo-II Takip edilebilen hastalarımızın klinik dökümantasyonu

	Yaş/Cins	B/M	Lok	KT	İzlem süresi (yıl)
Olg.1	66E	M	Mide	-	2, SS
Olg.2	43E	M	Kolon	+	2, *
Olg.3	60K	M	Kolon	+	1, *
Olg.4	49K	M	Kolon	+	1, *
Olg.5	55K	B	Kolon	-	11, SS

B: benign, M: malign, Lok: lokalizasyon, KT: kemoterapi, SS: sağ, sağlıklı, *: belirtilen sürelerden sonraki takibi bilinmiyor.

BULGULAR

Hastalarımızın 16'sı kadın, 7'si erkek ve Kadın/Erkek: 2,2 idi. Yaş ortalaması 47,9 olup, 22-68 yaşları arasındaydılar.

Hastanemize başvuru nedenleri arasında % 69'unda karın ağrısı, % 38'inde GI kanama, % 23'ünde karında kitle, % 7'sinde iştahsızlık, bulantı-kusma gibi şikayetlerin bir veya birkaçı vardı.

Olguların 13'ü ince barsak, 5'i kalın barsak, 4'ü mide ve 1 tanesi de oral mukozada lokalizeydi (Resim 1).

Mitoz sayısı sonucu vakalarımızın 7'sinin malign, 16'sının benign düz kas tümörü grubunu oluşturduğu saptanmıştır.

Neoplastik lezyonların en büyük boyutu dikkate alındığında 1-20 cm çapları arasında değişen büyüklüğe sahiptiler (ortalama 7,7 cm, leiomyomlar için: 6,9 cm, leiomyosarkomlar için: 10,1 cm). Leiomyomlar ile leiomyosarkomlar arasında TÇ değişkenine göre p değeri (p=0.09 (p>0.05)) olarak bulunmuştur (Tablo 1).

AS; leiomyomlarda 1.1-6.000 (ortalama: 3.147) arasında değişmekte iken, leiomyosarkomlarda 1.550-18.000 (ortalama: 5.279) arasındaki değerlere sahipti. Benign ve malign düz kas tümörleri arasında AS açısından bir fark olup olmadığını student-t testi ile değerlendirdiğimizde $p=0.09$ ($p>0.05$) olarak belirlendi (Resim 2).

PCNA indeksi sayım sonucunda; tüm olgularımız 2-113 arasında değişen değerlere sahipti. Bu değerler leiomyosarkomlar için 12-113 arasında değişmekte ve ortalama 52,7 idi; leiomyomlar için ise 1-66 arasındaki değerlere sahip olup, PCNA indeksi ortalaması bu grup için 26,4 idi. Bu iki grup arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Student-t testi uyguladığımızda T değeri 1.9819 olup, $p=0.0307$ ($p<0.05$) idi yani leiomyomlar ile leiomyosarkomlar arasında PCNA indeksine göre anlamlı bir fark mevcuttu (Resim 3).

Her iki grup birlikte değerlendirildiğinde AS ile Pİ arasında (PCNA:0.212) zayıf bir ilişki saptandı.

Hastane arşivimizde bu hastalardan 9'unun dosyası bulunamadı. Mevcut dosyaların beşinde 1-11 yıllık bir izlem saptandı (Tablo 2), ayrıca 3 hastanın postoperatif nonneoplastik nedenlerle eksitus olduğu anlaşıldı, kalan 6 dosyada ise yeterli postoperatif izlem bulunamadı. Hastalarımızın hiçbirine mevcut kayıtlara göre radyoterapi uygulanmamıştır. 7 leiomyosarkom olgumuzun 4'üne kemoterapi (Dactinomycin, Endoxan, Oncovin, Doxorubicin, Dacorbazin kombinasyonlarından oluşan) uygulanmış olup, tedavi sonrası takip yapılamamıştır. Hastanemiz kayıtlarındaki bu yetersizlik nedeniyle PCNA antikor ve AgNOR sonuçlarının bu tümörlerin prognozu ile olan ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

TARTIŞMA

Gastrointestinal sistemin düz kas tümörlerine ilişkin bu retrospektif çalışmada; genel olarak klinikopatolojik veriler kullanılarak, bu neoplazmların biyolojik davranışı belirlenmeye çalışılmıştır. Serimizdeki olgu sayısı az olmakla beraber, bu neoplazmların da nadir olduğu unutulmamalıdır (1): Mc Grath ve arkadaşlarının 51 vakalık GİS sarkoma serilerinde ortalama yaş 53 olup, E/K: 1,8/1; Evans'ın 56 vakalık Gİ düz kas tümörleri serisinde ise vakaların 5-7. dekatlarda yoğunlaştığı, E/K:1/1 olduğu dikkati çekmektedir (1,2). Bizim serimizdeki demografik veriler yaş açısından benzer (ortalama:47,9) olmakla beraber, cinsiyet açısından relatif olarak kadın eğilimi (E/K:1/2,2) söz konusuydu.

Semptomları irdeliyecek olursak; McGrath'ın serisinde karın ağrısı % 62, Gİ kanama % 40, karında kitle % 38, iştahsızlık, bulantı-kusma % 28 oranında izlenirken, bu oranlar bizim grubumuzda sırasıyla % 69, % 38, % 23, % 7 şeklinde bir benzerlik gösteriyordu.

Biyolojik davranışlarını belirlemek amacıyla; bu konuya ilişkin literatür incelendiğinde, birbirine benzer ama minör farklılıklar gösteren sistemlerle karşılaşılabilmektedir. Örneğin; McGrath Gİ sarkomlarda 0-4 mitoz/10 BBA bulunanları Grade 1, 5-9 mitoz/10 BBA bulunanları ise Grade 2, 10 mitoz/>BBA bulunanları ise Grade 3 olarak değerlendirirken, Evans

10>mitoz/10BBA içeren leiomyosarkomları "high grade", 1-5 mitoz/10BBA içerenleri "low grade" leiomyosarkom olarak kabul etmekte ve serisindeki 2 leiomyomun <2 cm çaplı olduğunu ve mitotik figür göstermediğini belirtmektedir (1,2). Yu ise 60 vakalık Gİ stromal tümör serisinde; 0-2 mitoz/30BBA olanları benign neoplazm, 3-4 mitoz/30BBA olanları borderline, 5>mitoz/30BBA olanları malign neoplazm olarak değerlendirmiştir (3). Son olarak ise Amin; 5cm<çaplı ve 4<mitoz/50BBA olanları benign, 5 cm> çaplı ve 4<mitoz/50BBA olanları borderline, 5>mitoz/50BBA ve herhangi bir boyutta olan lezyonları ise malign olarak kabul etmiştir (4). Biz ise bu çalışmada 0-4 mitoz/10BBA olanları benign, 5<mitoz/10BBA olanları malign olarak değerlendirdik.

Mitoz yanısıra, biyolojik davranışı anlıyabilmek için sellülarite, nükleer pleomorfizm, hücre şekli ve nekroz olup olmadığı da bazı makalelerde incelenmiştir. Ama yine bu makalelerin de vurguladığı önemli bir nokta, gastrointestinal düz kas tümörlerini derecelendirirken ve prognoz tayini yaparken sadece bu morfolojik kriterlerin yeterli olmadığı şeklindedir. Bu konuyu biraz daha detaylandırarak olursak; mitoz sayımına etki eden faktörleri anımsamak yeterli olacaktır (fiksasyonun şekli ve süresi, örnekleme hataları, intratümöral heterojenite, piknotik nükleuslar ve değerlendirme hataları gibi).

Bu amaçla günümüzde tümör proliferasyon indeksleri ve AgNOR yardımcı yöntemler olarak kullanılmaktadır. TPİ'ni belirlemede PCNA yanısıra Ki67, BrdU, MPM2 gibi immünohistokimyasal belirleyiciler ve "flow cytometric" değerlendirmeler yapılmaktadır. AFİP'den Cunningham ve arkadaşlarının yaptıkları 1975-1986 yıllarına ait 122 hastanın "flow cytometric & image cytometric" değerlendirmesinde; G2M evresindeki hücre fraksiyonunun, G0/G1 pikindeki anöploidinin ve G2M pikindeki anöploidinin mortaliteyi gösteren önemli belirleyiciler olduğu, buna karşın "image cytometric" değerlendirmelerin malign potansiyeli göstermede faydalı olmadığı vurgulanmaktadır. Ancak bu çalışmada dikkat edilmesi gereken diğer bir konuda; tek değişkenli istatistiksel incelemelerde $p<0.10$ değerinin kullanılmış olmasıdır (5). Çalışmamızda PCNA indeksi açısından benign ile malign stromal tümörler açısından anlamlı bir fark olduğu ($p<0,05$) ortaya çıkmıştır. Bu konuda literatür gözden geçirildiğinde benzer sonuçlar mevcuttur (3,4,6). Yu ve arkadaşları araştırmalarında PCNA indeksi yanısıra AgNOR skoru açısından da olgularını değerlendirmişler ve nükleus başına düşen AgNOR skorunu histolojik grade ile korele olarak bulmuşlar, ancak PCNA indeksi ile AgNOR skoru arasında lineer bir ilişki gösterememişlerdir. (3). Bizim çalışmamızda ise AgNOR skoru açısından leiomyomlar ile leiomyosarkomlar arasında anlamlı bir fark bulunamamış ve PCNA indeksi ile AgNOR skoru arasında zayıf bir lineer ilişkisi saptanmıştır.

Çalışmamızın en önemli eksikliğini hasta kayıt sistemimizdeki yetersiz klinik dökümantasyon oluşturmaktadır. Bu nedenle bu morfolojik kriterlerin prognozla ilişkisini belirleyemedik.

Değerlendirdiğimiz parametreler arasındaki korelasyon zayıflığı; malign transformasyonun proliferatif karakterle olan ilişkisinin bugün için henüz bilmediğimiz yönleri olduğu var sayımını akla getirmektedir. Bundan başka olgu sayısı azlığı da bu sonucu doğurmuş olabilir.

Sonuç olarak AgNOR skorunun ve PCNA indeksinin prognozla ilişkisini belirleyememiş olmakla beraber, bunların gastrointestinal düz kas tümörlerinin biyolojik davranışını belirlemede mitotik sayıma ek olarak yardımcı parametreler şeklinde kullanılabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. McGrath PC, Neifeld JP, Lawrence W, Kay S, Horsley WS, Parker GA. Gastrointestinal sarcomas, Analysis of prognostic factors. *Ann surg* 1987; 206:706-710.
2. Evans HL. Smooth Muscle Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Cancer* 1985; 56:2242-2250.
3. Yu CC, Fletcher CD, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J Path* 1992;166:147-152.
4. Amin MB, Manik CK, Linden MD, Kubus JJ, Zarbo RJ. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 1993;100:428-432.
5. Cunningham RE, Federspiel BH, McCarthy WF, Sobin LH, O'leary TJ. Predicting prognosis of gastrointestinal smooth muscle tumors. *Am J Surg Pathol* 1993;17:588-594.
6. Sbachnig RJ, Cunningham RE, Sobin LH, O'leary TJ. Proliferating-cell nuclear antigen immunohistochemistry in the evaluation of gastrointestinal smooth-muscle tumors. *Modern Pathology* 1994; 7:780-783.