

Rekürren ve Nonrekürren Menengiomalda Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunoreaktivitesi

Dr. Şahsine Tolunay

ÖZET

Menengiomal histolojik olarak benign tümörler olarak görünürse de rekürrens nadir değildir. Makroskobik total çıkarılmalarından sonra benign tiplerde % 9, ağırsif tiplerde ise daha yüksek oranlarda rekürrens görülür. Histopatolojik özelliklerine bakarak biyolojik davranışlarını önceden belirlemek kolay olmadığı için, menengiomalarda PCNA immunoreaktivitesi ile proliferatif aktivite arasındaki ilişkiyi gözlemek istedik. Makroskobik total çıkarıldıktan sonra klinik olarak takip edilen 15 nonrekürren ve 5 rekürren menengioma olgusuna ait parafin çıkarttık. Anti PCNA (PC 10) ile immunohistokimyasal yöntemle boyadıktan sonra PCNA Labeling indeksi (LI) saptayarak; birbirleriyle kıyasladık. Rekürren ve nonrekürren olguların ortalama PCNA LI değerleri arasında istatistiksel ilişki saptayamadık.

Anahtar kelimeler : Proliferatif aktivite, proliferating cell nuklear antigen, rekürren menengioma.

GİRİŞ

Menengiomal primer intrakraniyal tümörlerin ortalama % 15 ini oluşturan sık görülen tümörlerdir. Çoğunluğunu tipik menengiomal oluşturur ve meningotelyal, fibroblastik, transizyonel, psammomatöz anjiomatöz subtipleri kapsar. Subtiplerin prognostik önemi çok azdır. Tipik menengiomal kapsüllü yavaş büyüyen benign beyin tümörleridir. Rekürrens oranı % 15-20'dir. Cerrahi eksizyon ve rekürrens arasındaki süre 5.5 yıl olup postoperatif prognozu etkileyen önemli faktör eksizyonun total olup olmamasıdır. Rekürrens en sık duraya tutunan parça bırakıldığında ya da bölgesel küçük satelit lezyonlar bulunduğu gelişir.^{1,2} Bütün menengiomalının % 0.9-11'i çok hızlı büyür ve çevre dokuları infiltre eder. Bu şekiller atipik veya malign menengioma diye isimlendirilir. Atipik menengiomal atipik hücrel özellikler gösterir. Belirgin hücre zenginliği, çok sayıda mitoz, fokal nekroz özelliklerinden iki veya üç tanesini taşıyan menengiomalardır. Eksizyondan 1.5 yıl sonra yaklaşık % 50'si nükseder.^{1,3} Malign (anaplastik) menengiomal, çevre beyin parankim invazyonu, metastatik menengioma, malign histolojik özellikler (malign sitoloji, yüksek mitotik index, bariz nekroz), papiller menengioma, kriterlerinin en az bir tanesini gösterirler.^{1,3} Pratikte bu kriterlerin doğruluğu şüphelidir. Çünkü sıklıkla tümörün morfolojik görünümü ile

SUMMARY

Although meningiomas histologically known as benign tumors their recurrence are not rare. After totally removal of these tumors 9 % recurrence seen in benign types and higher recurrence seen in aggressive forms.

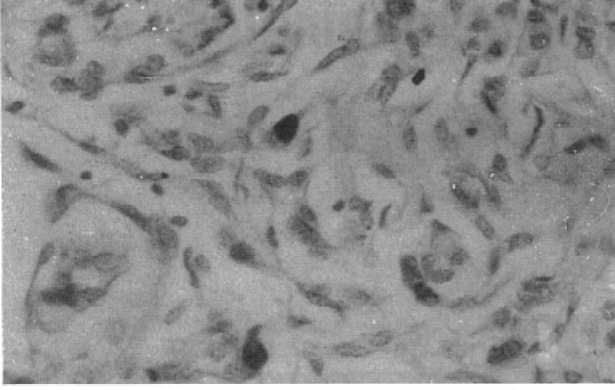
Because of difficulty indetermning the biologic behaviour of meningiomas looking to their histologic criteria, we tried to observe the relation between their proliferative activity and their immunoreactivity to PCNA (PC 10) antibody. We took out paraffin blocks of 15 nonrecurrent and 5 recurrent meningioma cases-tumors of these cases were macroscopically totally removed-from pathology department of Uludağ University We stained these with anti-PCNA (PC 10) immunohistochemistry method and to determine the PCNA labeling index (L.I.) and their relation with each other. We could not find any statistical relation between mean values of PCNA-labeling index-and recurrent, nonrecurrent cases.

Key words : Proliferative activity, proliferating cell nuclear antigen, becurrent menengioma.

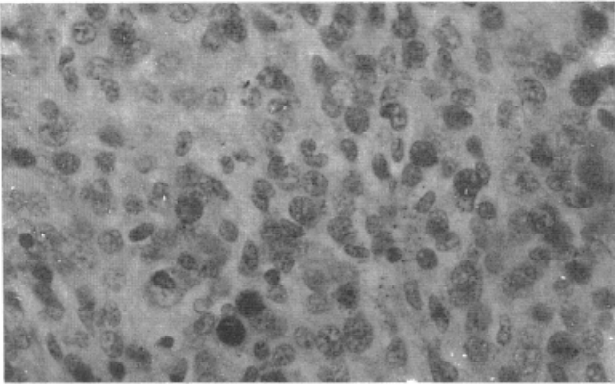
biyolojik davranışı uyumlu değildir. Ayrıca bu parametrelerin çoğu subjektiftir ve miktarını belirlemek zordur.³ Bazen histolojik olarak tipik bir menengiomu, sonraki rezeksiyonlarında bariz malign süreçse dönüştüğü bildirilmiştir.^{1,2} Bu özellikler, menengiomalarda sadece mikroskobik özellikler ile hangi tümörün rekürrens yapacağını ve bu rekürrens oluşumundan önceki interval süresinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır.¹ Bu nedenle tümör proliferasyonu ve kinetiklerinin değerlendirilmesini kolaylaştırmak için daha objektif isimler araştırılmaktadır. Bunlardan biri immunohistokimyasal yöntemle nukleer PCNA'nın tesbit edilmesidir. Bu çalışmada rekürren ve nonrekürren menengioma olgularında PCNA araştırıldı. Amacımız PCNA immun boyasının menengiomalarda biyolojik davranışlarını belirlemedeki yararlılığını saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1982-1989 yılları arasında opere edilmiş makroskobik total çıkarıldıktan sonra en az 6 yıl yeni tümör gelişimi olmayan 15 olgu nonrekürren grupta, 1983-1993 yılları arasında opere



Resim 1 : Nonrekürren transinsizyonel menengioma olgusunda az sayıda hücrede nükleer anti PCNA boyanması. (x400)



Resim 2 : Rekürren atipik menengioma olgusunda çok sayıda nükleusta değişik derecelerde anti PCNA boyanması (x400)

edilmiş, makroskopik total çıkarıldıktan sonra 13 yıl sonara yeniden tümör gelişimi saptanan 5 olgu rekürren grupta incelendi. Rekürren ve nonrekürren olgulara ait bloklarla birlikte Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden seçildi. Bütün tümör dokuları % 4'lük formalinde tesbit edildikten sonra, rutin işlem görmüş ve parafine gömülmüştür. Dünya Sağlık Teşkilatının kriterlerine göre grade'lendirildi ve sınıflandırıldı. Klasik (tipik) menengiomalar Grade I, Atipik menengiomalar Grade I/II olarak kabul edildi.^{1,3} Seçilen parafin bloklardan hazırlanan 6 mikronluk kesitler deparafinizasyon yapıldıktan sonra Peroksidaz antiperoksidaz tekniği ve Avidin Biotin kompleks yöntemi ile boyandı. Primer antikor olarak DAKO monoklonal kullanıldı PC 10 predilüe formu kromojen olarak DAB kromojen kullanıldı. Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Her boyama işleminde pozitif ve negatif kontrol boyamaları uygulandı. Hücreler A Plan objektifli Carl Zeiss marka mikroskopta 40/0.65 x 10 büyütmede tümörün hangi gruba dahil olduğu bilinmeden sayıldı. Sayımlar boyanmanın yoğun olduğu bölgelerde en az 10 büyük büyütme alanında yapıldı. Her tümörde 1000 hücre sayılarak PCNA ile boyanmış nükleus sayılarının yüzdesi PCNA LI olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak reaktif hiperplazi gösteren tonsil dokuları kullanıldı. Germinal merkezde hücrelerin % 90'ından fazlası

PCNA ile boyandı. Negatif kontrol olarak her tümörden hazırlanan kesitler boyama işlemi sırasında primer antikor yerine negatif kontrol solüsyonu uygulandı.

BULGULAR

PCNA tüm tümörlerde nükleer bir boyama gösterdi. Boyanma şiddeti hücreler arasında farklılıklar göstermekteydi. Boyandığı ayırdedilebilen tüm hücreler boyanma şiddetine bakılmaksızın pozitif kabul edildi. (Resim 1 ve 2). Bazı tümörlerde pozitif hücreler diffüz dağılım gösterirken, bazı tümörlerde pozitif hücrelerin fokal alanlarda topluluklar oluşturduğu izlendi. Nükleuslar genellikle granüler bazen koyu homojen boyanma gösteriyordu. Mitotik hücrelerde, soluk stoplazmik boyanma izlendi. Nonrekürren olguların histolojik

Olgu No.	Grade	Subtip	PCNA LI(%)
1	I	FM	6
2	I	TM	4
3	I	MM	3
4	I	MM	7.2
5	I	MM	6.1
6	I	MM	11
7	I	MM	10
8	I	PM	29.6
9	I	FM	1
10	I	MM	0
11	I	MM	7
12	I	MM	12.3
13	I	MM	2.6
14	I	MM	2
15	I	TM	6.1

Tablo 1 : Nonrekürren olguların subtipleri grade'leri ve PCNA LI değerleri. (FM: Fibröz menengioma, TM: Transizyonel menengioma, MM: menegotelyomatöz menengioma, PM: psammomatöz menengioma).

Olgu No.	Grade	Subtip	İlk tümörde PCNA LI(%)	İkinci Tümörde PCNA LI(%)
1	I/II	At.M	11.2	29.7
2	I	TM	4.3	20.2
3	I	FM	6	12
4	I	MM	31.3	14.7
5	I/II	At.M	9.8	16.1

Tablo 1 : Rekürren olguların subtipleri grade'leri ilk ve ikinci tümörlerindeki PCNA LI değerleri. (At.M: atipik menengioma, TM: transizyonel menengioma, FM: fibröz menengioma, MM: menegotelyomatöz menengioma).

subtipleri, grade'leri ve PCNA LI değerleri Tablo I ve II de görülmektedir. Nonrekürren olguların tamamı Grade I idi. 9 olgu menenjiotelyomatöz, 2 olgu transizyonel, 1 olgu psamatöz tip menenjioma idi. PCNA LI değerleri 0-29,6 ortalama 7,19 olarak hesaplandı. Rekürren olguların 2 tanesi atipik menenjioma (Grade I/II), 1 tanesi menenjiotelyomatöz, 1 tanesi transizyonel, 1 tanesi fibröz tipde idi. PCNA LI 12-29,7 arasında ortalama 18,68 olarak bulundu. Rekürren olguların ortalama PCNA LI değerleri nonrekürren olgulardan yüksek olmasına karşın Mann-Whitney testi ile istatistiksel bir ilişki saptanmadı. Olgular tek tek değerlendirildiğinde nonrekürren olgulardan bazılarında rekürren olgular kadar yüksek PCNA LI değerleri bulunurken, bazı rekürren olgulardan da oldukça düşük PCNA LI değerleri saptandı. Olgu sayımızın azlığı nedeniyle tümör gradeleri, histolojik subtipleri, rekürren olgulardan birinci ve ikinci tümörlerin PCNA LI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmedi.

TARTIŞMA

Konvensiyonel histolojik teknikler menenjiomaların büyüme paternini önceden tesbit etme ve rekürrens riskini önceden belirlemede yetersizdir.⁴ Son yıllarda normal ve patolojik olaylarda hücre proliferasyonu ile ilgili nicel ve nitel bilgiler elde edilmesinde dikkate değer ilerlemeler kaydedilmektedir.^{4,5} Hücre proliferasyonu yıllarca rutin histopatolojik çalışmalar için hazırlanmış kesitlerde mitotik figürlerine sayılmasıyla ölçülmüştür. Mitoz saymak basit bir yöntem gibi görülsede hem kuramsal hem de uygulamada önemli bazı kısıtlamalar vardır. Bunlar mitozdaki hücrelerin belirlenmesinin zorluğu, gözlemciler arasında belirgin sayı farklılıkları olması, yeterince fikse olmamış dokularda mitoz sayısının olduğundan az çıkmasıdır.^{6,7}

Hücre proliferasyonunu DNA içeriğini Timidin işaretlenmesi ve Bromodeoksiüridin (Brd U) inkorporasyonu ile ölçülmesi deneysel çalışmalarda uygulanabilir fakat rutin olarak uygulanması olanaksızdır.^{4,7} Flow sitometride doku yapısının bozulması, neoplastik hücrelerin yanında non neoplastik hücrelerin hesaba dahil olmaları gibi sakıncaları vardır.^{5,7} Gümüş ile boyanmış nukleolarlar düzenleyici bölgelerin (AgNOR) sayılmasında fiksatif tipi, fiksasyon süresi ve boyama koşulları sonuçları etkilemektedir.^{5,8}

Hücre proliferasyonunun immunohistokimyasal metodlarla değerlendirilmesinde temel prensip, antijenler olarak tanınan hücresel proteinler ve diğer moleküllerin miktarı veya dağılımında hücre siklusu ile ilişkili değişiklikler bulunmasıdır.⁸ Hücre ile ilişkili antijenler nukleusta stoplazmada veya hücre membranında lokalize olabilir. Bunlar hücre siklusunun bütün fazları veya tek bir fazla ilişkili olabilirler. DNA polimeraz delta, DNA polimeraz alfa, P 105 ya karşı antikolar mevcuttur.⁹ Monoklonal antikolar içinde en spesifik olanı Ki - 67 olup, hücre siklusu ile ilişkili bir antijeni tanımlamaktadır. Bu antikorun kullanımında en önemli kısıtlama taze materyal gerektirmesi, fiksatiflere karşı çok duyarlı olmasıdır. Bu yüzden arşiv materyallerinde ve fiksatif içerisinde gelen dokularda kullanılamaz.^{8,9,10,11}

Anti PCNA (PC 10) yeni bir proliferasyon markırı olup

formalinde fikse edilmiş, parafinde bloklanmış proliferating cell nukleer antijeni tanıtır. PCNA bu DNA sentezi için gerekli intranükleer bir polipeptittir. Hücrenin proliferasyon durumu ile paralellik gösterir. En yüksek konsantrasyon geç G1 fazı ve S fazında görülmektedir. G2 de daha az, M fazında çok düşük seviyede ve G0 de ise hiç saptanmamaktadır.^{3,10}

Çeşitli benign ve malign tümörlerde hiperproliferatif lezyonlarda ve normal dokuların proliferatif kısımlarında PCNA ile çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Meme tümörleri, gastrointestinal stromal tümörler, gastrik karsinomlar, hematolojik maligniteler, over tümörleri, hipofiz adenomları, nöroglial tümörler, akciğerin nöroendokrin tümörleri hemanjioperisitomalar ve bir çok solid malign tümörde PCNA'nın tümör grade'i, klinik seyir ve diğer prognostik parametreler ile ilişkisini gösteren ve bazıları birbiri ile çelişen sonuçlar dikkati çekmektedir.^{3,12,13}

Zimmer ve arkadaşları 21 atipik/malign ve 18 benign menenjioma olgusunda PCNA LI'yi 0.1-40 arasında bulmuşlardır. Bütün tümörlerde dikkate alındığında PCNA skorları ile histolojik grade arasında hiçbir pozitif korelasyon bulunmamış, sadece PCNA skoru ve mitotik indeks arasında zayıf bir ilişki ortaya konmuştur. AgNOR sayıları ve tümör grade'i arasında ise daha yüksek bir korelasyon saptanmıştır.³

Alegransa ve arkadaşları; 70 beyin tümörü içindeki 6 menenjioma olgusunda PCNA LI'nin %0.15 arasında değiştiğini, histolojik grade, tritiated timidin LI, Bromodeoksiüridin LI ve Ki 67 li ile paralellik gösterdiğini saptamışlardır.¹⁴

Korkolopoulcu ve arkadaşları; toplam 77 santral sinir sistemi tümörü içindeki 23 menenjioma olgusunda PCNA LI ve AgNOR değerlerini kıyaslayarak Grade I menenjiomalarda PCNA LI % 4.77, Grade II olguda % 45, Grade IV olguda ise % 90 bulmuşlardır. PCNA ekspresyonunun AgNOR sayımlı ile uyumlu olduğu, ancak PCNA ve AgNOR değerlerinin tümör gradları arasında belirgin bir paralellik bulunmadığı gözlenmiştir.¹⁵

Eva Karamitopoulcu ve arkadaşları 140 santral sinir sistemi tümöründe PCNA immunoreaktivitesini araştırmışlardır. Benign tümörlerde genellikle PCNA LI değerlerinin düşük, malign tümörlerde yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada araştırılan 51 menenjioma olgusunda PCNA LI ortalama değerleri % 3.80, 7.35 olarak bulunmuştur. Ortalama PCNA LI değerleri histolojik grade'i yansıtır gibi görülsede bütün tümör gruplarında zıtlıklar ortaya çıkmıştır.¹²

Her immunohistokimyasal metod gibi PCNA boyaması da bazı teknik değişkenlerden etkilenir. Doku fiksatif ve spesifik PCNA antikoru klonu belirtilmelidir. Çünkü klonların bireysel reaktivitesi fiksasyonun koşulları ile büyük ölçüde değişebilmektedir. PC 10 kesitler, ısıtmakla boya şiddeti azaldığından oda sıcaklığında havada kurutulmalıdır. Kaç tane hücre sayılmalıdır sorusuna kesin yanıt yoksa da 1000 hücre saymada hemen hemen fikir birliğine varılmıştır.¹⁶ Birçok araştırmacı her türlü nukleoplazmik boyanmayı pozitif sayar, boyanma şiddetini dikkate almaz. Bazıları ise belirgin boyanmayı pozitif sayar. Bu durumda çalışmalar arasında standartizasyon bozulmaktadır. Bunun çaresi imaj analizi ile bulunabilir.^{12,13} Kullanılan antikor konsantrasyonu önemlidir. Konsantrasyon

arttığında pozitiflik oranının arttığı bildirilmiştir.¹⁶ Bizim pozitif kontrol materyallerimizdeki germinal merkezlerde hücrelerin %90'ından fazlasının boyanması kullandığımız antikör konsantrasyonunun uygun olduğunu göstermektedir. PCNA immun boyanmasında fiksasyon süresinin kritik önemini dikkate alırsak, arşiv materyallerinde farklı fiksasyon sürelerine maruz kalmış, hatta farklı tip fiksatiflerde bırakılmış dokuları aynı gruba alıp kıyaslamalar yapmaktayız. Olgu seçiminde nonrekürren olguların belirlenmesinde makroskopik total çıkarıldıktan sonra en az 6 yıl nüksetmeyen, olgular seçilmiştir. Menengiomalarda on yada yirmi yıl sonra nüksetme olasılığını göz önüne alırsak nonrekürren olguların daha uzun süre

izlenmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Benzer şekilde makroskopik total çıkarılan rekürren gruptaki olguların mikroskopik düzeyde residiv içerenleri bulunabilir.

Bu çalışmamızın sonucunda rekürren menengiomalarda ortalama PCNA LI değerleri nonrekürren olgulara göre, yüksek bulunmuş ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kaynaklarda da PCNA LI in menegiomaların proliferatif aktivitesini önceden belirlemede geçerli kesin kriter olduğu gösterilememiştir. Bu nedenle PCNA LI i tek tek menengioma olgularında biyolojik davranışı belirlemede kullanmadan önce teknik şartları standardize edecek koşullar sağlandıktan sonra uzun süreli takip edilen geniş olgu serilerini kapsayan yeni çalışmaların sonuçları beklenmelidir.

KAYNAKLAR

- Nelson J S, Parisi J E, Schochet S S. Principles and Practice of Neuropathology, First ed. St. Louis. Mosby, 1993, 203-206.
- Russell D S, Rubinstein L J. Pathology of Tumors of the Nervous of the Nervous System, 5 th. ed. London: Edward Arnold, 1989, 450-500.
- Zimmer C, Gottshalk J, Navarro J C, Martin H, Beil M, Jautzke G. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atypical an malignant meningiomas. Pat. Res. Pract. 1992; 188: 951-958.
- Woosley J T. Measuring cell proliferation, Arch. Pathol. Lab. Med. 1991; 115:555-567.
- Cohen S M, Ellwein L B. Cell proliferation in carcinogenesis. Science, 1990; 249: 1007-1011.
- Hall P A, Levison D A, Review: Assessment of cell proliferation in histological material J. Clin. Pathol. 1990; 43: 184-192.
- Bacchi C E, Gown A M. Detection of cell proliferation in tissue sections. Brazilian J Med. Biol Res., 1993; 26: 677-687.
- Hall P A, Woods A L. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. Cell Tiss Kinet. 1990; 23: 505-522.
- Nakamura R M, Tan E M. Autoantibodies to nonhistone nuclear antigens and their clinical significance. Hum. Pathol. 1983; 14: 392-400.
- Louis D N, Edgerton S, Thor A D, Hedley E T. Proliferating cell nuclear antigen and Ki 67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. Acta Neuropathol 1991; 81: 675-679.
- Kunushio K, Nishuma N, Matsuhisa T, Tsun K, Matsumi N, Satch T. Immunohistochemical demonstration of DNA polymerase in human brain-tumor cells. J Neurosurg. 1990; 72: 268-272.
- Karamitopoulou E, Perentes E, Melachrinou M, Maraziotis T. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. Acta Neuropathol 1993; 85: 316-322.
- Direnednack J H, Wisman J H, Keijzer R, Cornelis J H, Correlisse C J. Cell-cycle related staining patterns of anti proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd Labeling and Ki 67 staining. Am J Pathol. 1991; 138 (5): 1165-1172.
- Allegeranza A, Girlando S, Arrigoni G L, Veronese S, Mauri F A, Gambocorta M. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. Virchow's Archiv A Pathol Anat. 1991; 419: 417-423.
- Korkolopoulou P, Christodoulou P, Papanikolaou A, Tsagli E T. Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions in CNS tumors: Correlation with Histological type and Tumor Grade. Am J of Surg. Pathol. 1993; 17(9): 912-919.
- Gleb A B, Kamel O W, Le Brun D P, Warnke R A. Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin embedded tissues using two anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies. Factors affecting reactivity. Am J Pathol. 1992; 141(6): 1453-1459.