

Benign Prostat Hiperplazisi ve Prostat Karsinomunda Müsin Histokimyası ile Nükleoler Organizasyon Bölgeleri *Mucin Histochemistry and Nucleolar Organizer Regions in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma*

İpek Pınar¹, Kemal Bakır¹, Coşkun Özşarac¹

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D'nda 33 prostat karsinomu ile, 50 BPH değerlendirilmiştir. Tüm olgulara d-PAS+AB pH:2.5 ve AF+AB pH:2.5 boyaları ile AgNOR uygulanmıştır. Nötral müsinin BPH 'nde, asit müsinin ise karsinomda daha yoğun olduğu saptanmıştır. Gleason grade' i artışı ile asit müsin sekresyonunun azaldığı, ortalama AgNOR değerlerinin karsinomda daha yüksek olduğu, karsinomda ortalama AgNOR değerleri ile asit müsin sekresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı, AgNOR benekçiklerinin iri, düzensiz, kümeler oluşturmuş, pleomorfik, koyu kahverenkli lekeler şeklinde olduğu gözlenmiştir. Müsin histokimyasının, ayırıcı tanıda sitolojik ve yapısal özelliklerle birlikte yardımcı bir yöntem olarak kullanılabileceği, kombine boya yöntemlerinin zaman ve kesit sayısı açısından yararlı olduğu, AgNOR değerleri ile müsin sekresyonu arasında bir ilişki olmadığı, ancak AgNOR yönteminin tanı ve prognoz açısından destekleyici bir yöntem olarak kullanılabilmesi için standardizasyonun gerektiği sonucuna varılmıştır.

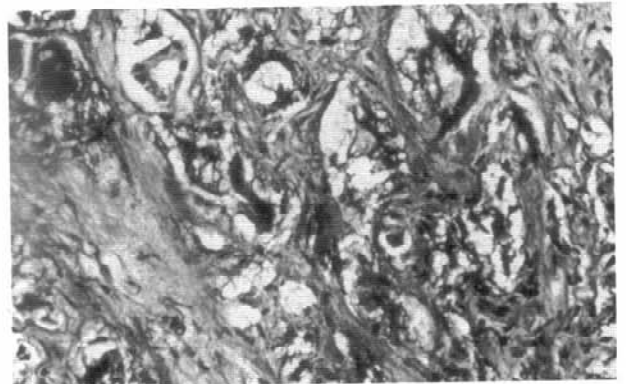
Anahtar Kelimeler : Prostat, müsin, AgNOR

This study has been held at Gaziantep University School of Medicine Department of Pathology in the period of 1992 -1997. Prostate cancer and BPH cases have been included to the study. d-PAS + AB pH : 2.5 and AF + AB pH : 2.5 combined stains and AgNOR have been performed. The intensity of neutral mucin in BPH was statistically greater than prostate carcinoma. In prostate carcinoma acid mucin secretion decreases when Gleason grade increases. Mean AgNOR levels in prostate carcinoma was statistically greater than BPH. In this study we conclude that combined staining techniques of mucin histochemistry can be used as auxiliary test in differential diagnosis. There is no relation between AgNOR levels and mucin secretion, but AgNOR can be accepted as an auxiliary diagnostic tool after standardization

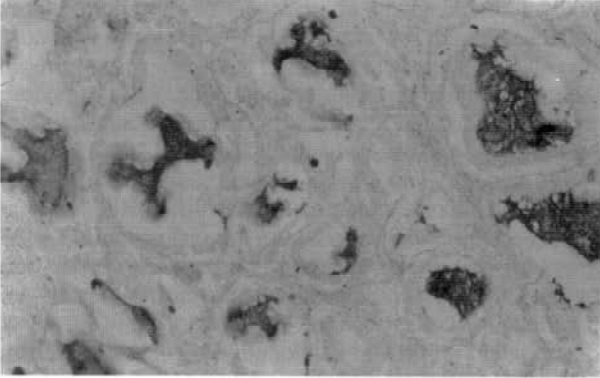
Key words : Prostate, mucin, AgNOR

Prostat karsinomu 50 yaş üzeri erkeklerde en sık görülen karsinom grubu iken, aynı yaş grubunda kanserden ölüm nedenlerinde ikinci sırayı almaktadır. Ortalama yaşam süresi giderek uzadığı için, 50 yaş üzeri erkeklerde prostat karsinomunun kesin tanı yöntemi olan iğne biopsisinin kullanımı giderek artmakta ve patoloğlar iğne biopsi materyalleri ile daha sık karşılaşmaktadırlar. İğne biopsi materyallerinin küçük olması, iyi differansiye karsinomların görülme sıklığının artması tanıda problemlere yol açmakta ve bazı yardımcı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Prostat asinüslerinde intraluminal asit müsin ve kristaloid varlığının yapısal ve sitolojik veriler ile birleştirildiğinde karsinom tanısı koydurduğu, kristaloid ve asit müsin gösterilememesinin ise karsinomu ekarte ettirmediği bilinmektedir. Özellikle ezilme "crush artefaktı" olan ve çok iyi differansiye karsinomlarda bu yardımcı yöntemlerin kullanılması tanıdan emin olmamızı sağlar⁽¹⁻¹⁰⁾.

Prostat karsinomunda nükleol özellikleri sitolojik ve histopatolojik materyallerde ayırıcı tanıda çok önemli bir yer tutmaktadır. Nükleer morfolojiyi değerlendirmede AgNOR yöntemi malign hücrelerde görülen nükleol bozukluklarını taramak ve differansiyasyon ile ilişkisini göstermek amacıyla kullanılmıştır.



Resim 1 : Karsinomda asit müsin yoğunluğu (d-PAS+AB pH: 2.5x20)



Resim 2 : Karsinomda non-sülfatlı asit müsin yoğunluğu (AF+AB pH:2.5x20).

Bu bilgiler ışığında asidik ve nötral müsinlerin konvansiyonel histokimya yöntemleri kullanılarak, Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) ve karsinom olgularındaki farklılığının gösterilmesi, karsinom olgularında differansiyasyonla ilişkisinin saptanması, ayrıca AgNOR yöntemi ile prostat karsinomlarında proliferatif potansiyelin, tümörün histolojik grade' i ve benign olgular ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1992 - 1997 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D 'nda prostat karsinomu tanısı almış 33 olgu ile 1996 - 1997 tarihleri arasında BPH tanısı almış, 230 olgu içerisinde 50 olgu bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır.

Prostat karsinomlu spesmenlerin 23'ü iğne biopsi materyali, 4'ü açık prostatektomi materyali, 3'ü TUR-P (Transüretral rezeksiyon-Prostat), 3'ü de radikal prostatektomi, BPH olgularının ise 38'i açık prostatektomi, 12'si de TUR-P materyalinden oluşmaktadır. Seçilen olgulara ait preparatlar yeniden gözden geçirilerek, karsinomlu olgularda tümörün en geniş izlendiği blok, BPH olgularında ise adenomatöz hiperplazinin hakim olduğu blok saptanarak, 4 mikronluk kesitler alındı. Tüm kesitlere d-PAS+AB pH:2.5, AF+AB pH:2.5 ve AgNOR boyaları yapıldı. d-PAS+AB pH:2.5 boyası uygulanan preparatlarda nötral ve asit müsin, AF+AB pH:2.5 boyası uygulanan preparatlarda sülfatlı ve non-sülfatlı asit müsin yoğunlukları şu şekilde değerlendirildi.

- 0 ; Hiç müsin yok
- 1 ; Preparatın %10-30'nda pozitif boyanma
- 2 ; Preparatın %30-70'nde pozitif boyanma
- 3 ; Preparatın %70'nden fazlasında pozitif boyanma.

Değerlendirilen tüm olgularda ortalama nötral ve asit müsin puanları saptandı. Karsinom olgularında bu ortalama değerler Gleason gradeleme sistemine göre iyi, orta ve az differansiye olgular için ayrı ayrı hesaplandı. BPH ve karsinom olgularında 0, 1, 2 ve 3 olarak sayımla belirtilen müsin yoğunluklarının karşılaştırılmasında ve karsinom olgularında AgNOR skoru ile asit müsin

yoğunluğunun karşılaştırılmasında Ki-kare testi uygulandı.

AgNOR Boyama Yöntemi:

1) 100ml deiyonize suya 1 gr/dl olacak şekilde formik asit eklendi. Bu karışım içine 2gr jelatin katıldı. Hafif ısıtılarak, tamamen çözünmesi sağlanıp, soğumaya bırakıldı.

2) 50gr/dl olacak şekilde gümüş nitrat, deiyonize su ile karıştırıldı.

3) AgNOR solüsyonu : Yukarıda tanımlanan %2 toz jelatin içeren formik asit solüsyonundan 1 volüm, gümüş nitratlı solüsyondan 2 volüm, boyama sırasında karıştırılarak elde edildi.

Çalışma solüsyonu lam üzerindeki kesitlere damlatıldı. Preparatlar oda ısısında, karanlık ortamda 35 dakika bırakıldı. Daha sonra preparatlar deiyonize suda çalkalanarak alkol, ksilden geçirilerek dehidrate edildi, entellan ile kapatıldı.

SONUÇ

Nükleus içinde yer alan nükleoler organizasyon bölgeleri siyah kahverengi, diğer tüm alanlarda zemin açık sarı renkte izlendi.

SAYMA İŞLEMİ

Tüm olgularda tanı ve histolojik grade bilinmeksizin x100 immersiyon objektif kullanılarak, nükleer membran ve granüler nükleer matriksin net seçildiği 100 nükleusta AgNOR benekleri Howat' ın önerdiği şekilde sayıldı. Ayrıca AgNOR beneklerinin özellikleri de gözden geçirilerek, boyut ve şekil farklılıkları da değerlendirildi.

AgNOR sayımı yapıldıktan sonra, her olgunun ortalama AgNOR skoru ve standart sapması belirlendi. Tüm lezyonlardaki ortalama değerler, ortalamalar arası farkın önem kontrolü (=student-t testi) ve Kruskal-Wallis yöntemine göre istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırılıp, "p" değerleri saptandı. AgNOR sayısı ortalamaları BPH ve karsinom grupları arasında, ayrıca karsinom olgularında Gleason gradeleri ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 33 karsinom olgusunun yaş ortalaması : 69,2, 50 BPH olgusunun ise 76,8'dir. d-PAS+AB pH:2.5 uygulanan BPH ve karsinom olgularındaki nötral ve asit müsin yoğunlukları Tablo-I' de gösterilmiştir. Nötral müsin BPH olgularında %94, karsinom olgularında %90, asit müsin ise BPH olgularında %18, karsinom olgularında ise %63,6 oranındadır.

Nötral müsinin BPH olgularında, asit müsinin (Resim-1) ise karsinom olgularında daha yoğun olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır (p<0,001).

AF+AB pH:2.5 boyası uygulanan BPH ve karsinom olgularında sülfatlı ve non-sülfatlı asit müsin yoğunlukları Tablo-II' de gösterilmiştir.

Sülfatlı asit müsinin BPH olgularında, non-sülfatlı asit

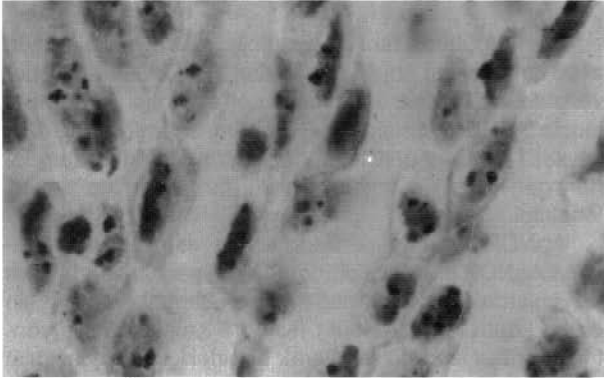
müsinin (Resim-2) ise karsinom olgularında daha yoğun olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ($p<0,05$).

BPH ve karsinom olgularında nötral ve asit müsin puanlarının ortalamaları saptanarak, karsinom olgularında bu ortalama değerler Gleason skorları için ayrı ayrı hesaplanmış ve Grafik-1' de gösterilmiştir.

AgNOR sayımı sonucunda BPH ve karsinom gruplarında ortalama AgNOR değerleri Tablo-III ' de gösterilmiştir.

Ortalama AgNOR değerlerinin , karsinom grubunda BPH 'den daha yüksek olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ($p<0,001$). Gleason gradeleri' ne göre tümör grupları arasında gruplardaki olgu sayılarının az olması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Karsinom olgularında AgNOR skoru ile asit müsin sekresyonu arasında ve AgNOR skoru ile non-sülfatlı asit müsin sekresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

AgNOR yönteminde sayım yanı sıra benekçikler şekil ve boyut açısından da değerlendirilmiştir. Karsinomda yüksek AgNOR değerleri (Resim-3) yanı sıra benekçikler kümeler oluşturmuş düzensiz, büyük, pleomorfik koyu kahverengi lekeler şeklinde izlenmiştir. BPH 'de ise AgNOR 'lar genellikle tek, küçük ve düzenli olarak gözlenmiştir.



Resim 3 : Karsinomda iri, multipl benekçikler (AgNORx100)

TARTIŞMA

Patologların günlük çalışmalarında tanı koymakta zorlukla karşılaştığı patolojilerden biri de prostat kanseridir. Yeni tanı ve biopsi yöntemlerinin kullanılmaya başlanması , iğne biopsilerinin sık kullanımı , yaşlı hastalarda cerrahi girişim olanaklarının artması , prostat kanserinin daha çok sayıda ve erken dönemde saptanması sonucunu doğurmuştur. Bu tür biopsilerin büyük kısmında materyalin küçük olması , bu yeni yöntemlerle giderek daha çok sayıda iyi differansiye kanserlere rastlanması, patoloğun tanı güçlüğüne arttırmakta , rutin yöntemlere ek olarak bazı yardımcı yöntemlerin de kullanıma girmesini gerektirmektedir. Tümörlerin histolojik olarak tiplenmesi, evrenlenmesi ve proliferatif potansiyellerinin değerlendirilmesi , prognozu belirleyen yöntemlerdendir . Nükleer morfolojiyi değerlendirmede

interfazik NORs dağılımının malign hücrelerde görülen nükleol bozukluklarını taramak için bir parametre olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür ⁽¹¹⁾. Prostat dokusunda asit mukopolisakkaritlerin varlığını göstermenin yapısal ve sitolojik veriler ile birleştirildiğinde karsinom tanısı koydurduğu , negatif boyanmanın ise karsinomu ekarte ettirmediği bilinmektedir.

Prostat kanserlerinde ilk müsin çalışmaları 1960'lı yıllara kadar uzanmaktadır. Foster ve Levine prostat kanserlerinde %63 ve bunların metastazlarında %36 oranında asit müsin varlığını , Mayer ' in müsikarmen boyası ile göstermişlerdir. Daha sonra Frank ve arkadaşları AB ile boyanan müsinlerin latent ve klinik belirti oluşturan prostat kanserlerine sıklıkla eşlik ettiğini , ancak normal glandlarda nadir olarak bulunduğunu saptamışlardır. Bunu Hukil ve arkadaşlarının prostatta asit müsin varlığının sıklıkla kanserlerle birlikte olduğunu gösteren çalışması izlemiştir. Daha sonra asit müsin varlığının prostat kanserlerinde diagnostik değeri olduğunu vurgulayan çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak asit müsinin sklerozan adenozis , müsinöz metaplazi , bazal hücre hiperplazisi gibi malignite ile sık karışan lezyonlarda da varlığının gösterilmesi , prostat kanserlerinde asit müsinin tanı değeri konusunda kuşkulara yol açmıştır ⁽¹⁻¹⁰⁾.

Prostatta malignite kuşkusunda, özellikle atipik küçük bez hiperplazisi , inflamatuvar atipi ile iyi differansiye küçük asiner prostat karsinomu ayırıcı tanısı yapılmadığında , AB pozitif lümen içi müsin ve kristaloid varlığının karsinom tanısını kesinleştirdiği ve ciddi crush (ezilme) artefaktı olan çok iyi differansiye adenokarsinomlarda , karsinom tanısından emin olmamızı sağladığı belirtilmektedir. Ama intraluminal asit müsin ve kristaloidlerin , küçük asiner prostatik karsinom ayırıcı tanısında yapısal ve sitolojik kriterlerin yerine kullanılmayıp , ancak onlarla birlikte değerlendirilmesi gerektiği kaydedilmiştir ⁽¹⁾.

Prostatik asinüslerde intraluminal sekresyonun yapısını belirlemek için histokimyasal yöntemlerin tamamını kullanmak zor ve zaman alıcı olacağından , d-PAS ve AB boyalarının kombine kullanımı tercih edilmelidir. PAS reaksiyonunun eklenmesi AB ile asinüslerde saptanan pozitif boyanmayı engellemediği gibi , stroma ve genel yapı çok daha iyi görülebilmektedir ^(1,5,6,9,12,13,14). Karsinomatoz glandlarda sıklıkla non-sülfatlı ya da sülfatlı sialomüsinlerin baskın olduğu bildirilmektedir ^(1,15,16). Çalışmamızda da karsinom olgularına uygulanan AF+AB pH:2.5 kombine boyasında AF ile sülfatlı asit müsinlerin daha yoğun olduğu gösterilmiştir. Foster ve Levine, Frank ve arkadaşları ile Hukil ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da asit müsinin BPH' nde %18 , karsinomda %63,6 oranında saptanması asit müsin pozitifliğinin sitolojik ve yapısal kriterlerle birlikte maligniteyi desteklediğini göstermektedir. Karsinom grubunda müsin miktarı tümör skorundaki artışa paralel bir düşüş göstermektedir.

Prostat dokusunda nötral ve asidik müsin üretimi , karsinom ile çok karıştırılan Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PiN) ve Atipik Adenomatöz Hiperplazi (AAH) olgularında da araştırılmıştır. Nötral müsin benign ve

	Nötral Müsin			Asit Müsin		
	0	1	2	0	1	2
BPH	3	16	31	41	9	-
Karsinom	2	25	6	12	17	4

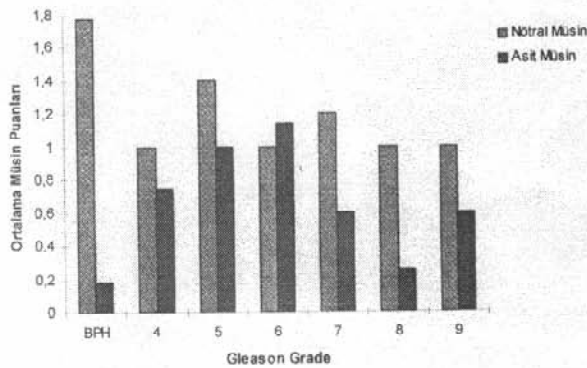
Tablo 1 : BPH ve karsinom gruplarında nötral müsin ve asit müsin yoğunluğu.

	Sülfatlı	Asit	Müsin	Non-Sülfatlı	Asit Müsin	
	0	1	2	0	1	2
BPH	40	10	-	27	16	7
Karsinom	32	1	-	8	16	9

Tablo 2 : BPH ve karsinom olgularında SAM ve NSAM yoğunluğu

Ortalama AgNOR değerleri	BPH	Karsinom	İyi differansiye karsinom	Orta differansiye karsinom	Az differansiye karsinom
	40	10	-	27	16

Tablo 3 : BPH ve karsinom differansiyasyonu göre ortalama AgNOR değerleri.



Grafik 1 : BPH ve karsinom olgularında ortalama müsin değerleri

neoplastik glandlarda saptanırken, asit müsin yalnızca karsinom ve yüksek grade'li PİN olgularında pozitif saptanmıştır (6,13,14,16).

Müsin histokimyasına ek olarak ayırıcı tanıda kullanılabilecek bir diğer yöntem de AgNOR'dur. AgNOR sayım yönteminden kaynaklanan bazı sorunlar: Kesit kalınlığı, takip solüsyonları, karanlık ortam, boyama süresi, ortam ısısı, sayım yöntemleri, sayılacak hücre seçimi ve artefaktlar farklı sayım sonuçlarının elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır^(17,18). Proliferatif bir indeksi yansıttığı yaygın olarak benimsenmiş olmasına karşın nükleoler organizasyon bölgelerinin değerlendirilmesinde ve evrensel nitelik kazanmasında, laboratuvar koşullarından, sayım biçimine değin standardize edilmesi gereken pek çok yön bulunmaktadır. Zaman alıcı bir yöntem olduğu da olumsuz bir özellik olarak ileri

sürülmesine karşın, daha duyarlı yöntemlerle sayım gerçekleştirilebildiğinde, oldukça pahalıya mal olan diğer yöntemler yanında ucuz bir alternatif olarak yer alabilecektir. Çalışmamızda BPH ve karsinom grubundaki genel AgNOR sayımı ortalamaları; BPH'de 1.84, karsinomda ise 2.78 olup, AgNOR yönteminin diagnostik ve prognostik olarak kullanışlı olabileceği sonucu istatistiksel olarak da desteklenmiştir.

Sonuç olarak prostat karsinomunda AgNOR değerlerinin diagnostik ve prognostik olarak kullanışlı olması, müsin histokimyasının şüpheli olgularda destekleyici bir bulgu olarak kabul edilmesi nedeniyle her ikisinin de ucuz ve kolay uygulanabilirliği de göz önüne alındığında tanı ve prognoz açısından kullanılabilişlikleri ortaya çıkmaktadır. Ancak AgNOR yönteminin standardizasyonu açısından seri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca asit müsin varlığının saptanması maligniteyi destekleyici bir bulgu olarak kabul edilmeli, ama asit müsin izlenmemesinin kanser olasılığını red ettirmeyeceği de unutulmamalıdır. Çalışmamızda BPH ve karsinom grubundaki genel AgNOR sayımı ortalamaları ise; BPH'de 1.84, karsinomda ise 2.78 olup, AgNOR yönteminin diagnostik ve prognostik olarak kullanışlı olabileceği sonucu istatistiksel olarak da desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ro GY, Grignon DJ, Toroncoso P, et al: Mucin in prostatic adenocarcinoma . Sem. Diagn.Pathol.5:273-283.
2. Franks ML, O'Shea DJ, Thomson RE : Mucin in the prostate; A histochemical study in normal glands , latent , clinical and colloid cancers. Cancer 1964; 17 : 983-991
3. Grignon DJ, Frances Po: Mucinous metaplasia in the prostate gland. Am J Surg Pathol 1993; 17 :287-290.
4. Shiraishi T, Kusano I, Watanabe M, et al : Mucous gland metaplasia of the prostate. Am J Surg Pathol 1993 17 : 616-622.
5. Pinder SE, McMahon RF: Mucins in prostatic carcinoma. Histopathology 1990 16 : 43-46,
6. Sentinelli S: Mucins in prostatic intra-epithelial neoplasia and prostatic carcinoma. Histopathology 1993;22 : 271-274.
7. Ro JY, Grignon DJ, Ayala AG, et al: Mucinous adenocarcinoma of the prostate:Histochemical and immunohistochemical studies. Hum Pathol 1990;21 : 593-600
8. Epstein JI, Fynheer J: Acidic mucin in the prostate : Can it differentiate adenosis from adenocarcinoma? Hum Pathol 1992; 23:1321-1325
9. Orhan D, Heper A, Erden E, et al: Prostat lezyonlarında müsin histokimyasının tanısal değeri. Türk Patoloji Dergisi 1994;10 : 17-19
10. Hukill PB, Vidone RA: Histochemistry of mucus and other polysaccharides in tumors. Lab Invest 1967; 16 : 395-406.
11. Bostwick DG: Prostate Specific antigen current role in diagnostic pathology of prostate cancer. Am J Clin Pathol 1994; 102 : 31-37
12. Yıldız K, Özoran Y, Harova G: Prostat adenokarsinomlarında histokimyasal nitelikler. Türk Patoloji Dergisi 1994; 12 : 39-40
13. Uysal V,Tuzlalı P, Kılıçaslan I: Prostat lezyonlarında müsin histokimyası. Türk Patoloji Dergisi 1994; 10:20-21.
14. Dizdar H , Ahıskalı R , Ekicioğlu G: Prostat kanserlerinde müsin sekresyonu. Türk Patoloji Dergisi 1994; 10: 21-22.
15. Cook HC:Theory and Practise of Histological Techniques (1 st ed). Bancroft JD. Edinburg London and New York. Churchill Livingstone. 1977, p:141.
16. Humprey PA : Mucin in severe dysplasia in the prostate. Surg Pathol 1991;4 : 137-143
17. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ : How should we count AgNORS ? Proposals for a standardized approach. Journal of Pathology 1989; 158 : 185-188.
18. Ahıskalı R, Alican Y, Ekicioğlu G,et al: Evaluation of three different AgNOR counting methods in advanced carcinoma of the prostate. The prostate 1995; 26 : 105-110.