

**PROSTAT HİPERPLAZİ VE KANSER DOKU ÖRNEKLERİNDE İKİ BOYUTLU
AgNOR DEĞİŞİKLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**
**Comparison of two Dimensional AgNOR Parameters in Prostate
Hyperplasia and Cancer Tissue Samples**

Perihan GÖKALP¹, Nurhan CÜCER², Atilla TATLIŞEN³, Nalan İMAMOĞLU⁴

Özet : Prostat kanseri ileri yaştaki erkeklerde en sık görülen kanserdir. Hastalığın başlangıcı ve doğal seyri sinsidir. Günümüzde hiçbir yayılımın izlenmediği lokalize hastalığın küratif tedavisi mümkün iken lokal invazif ve/veya metastatik prostat kanserinin tedavisi sorundur. Bu, etkin bir tedavi için hastalığın daha erken dönemde tanınması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. AgNOR boyama tekniğinin, tümörlerin erken tanısında, kısmi olarak malign tümörlerden benign tümörleri ayırt etmede ve malign tümörün şiddetini değerlendirmede faydalı bir test haline geldiği ileri sürülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, parafin bloklanmış doku örneklerinden alınan 3 µm'lik kesitlere deparafinizasyon, rehidratasyon ve gümüş boyama teknikleri uygulandıktan sonra hücrelerin mikroskoptaki görüntüleri video kamera aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Araştırma grubunu oluşturan 23 Prostat CA hastası (7 Grade1, 8 Grade2, 8 Grade3) ile kontrol (K) grubunu oluşturan 8 Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) üzerinde AgNOR değişikliklerinin karşılaştırılması amacı ile toplam AgNOR alanı/Çekirdek alanı (TAA/ÇA) değerleri bulundu. Aynı hasta ve kontrol grubu toplam AgNOR sayısı/Çekirdek (TAS/Ç) kriterine göre de değerlendirildi. Her bir örnekten 100'er hücre değerlendirmeye alındı ve tüm istatistiksel değerlendirmelerde tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Bu değerlendirmelere göre TAA/ÇA değerleri; G1, G2, G3, ve K grubu için sırasıyla; 5.94±2.41; 7.95±3.66; 8.18±3.42 ve 5.81±2.11 olarak bulundu. Karşılaştırmalar sonucunda G2-G3 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız (p>0.05) bulunurken, G1-G2, G1-G3, G2-K, G3-K (p<0.001) ve G1-K (p=0.003) grupları kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. TAS/Ç değerleri; G1, G2, G3 ve K grubu için sırasıyla 1.27±0.67; 1.36±0.68; 1.47±0.83 ve 1.35±0.59 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel karşılaştırmalar sonucunda G2-K grupları farksız bulunurken (p>0.05), G1-G3, G3-K (p<0.001) G1-G2, G2-G3 ve G1-K (p<0.05) grupları kendi aralarında anlamlı farklılık gösterdi. Sonuç olarak; TAA/ÇA metodunun malign bölgeleri benignden ayırt etmedeki üstünlüğü nedeniyle, prognostik parametre olarak kullanılabilmesi kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: AgNOR, prostat CA, benign prostat hiperplazisi (BPH)

Summary : Prostate cancer is a type of cancer, which usually occurs in elderly men. Its onset and course are insidious. The treatment of the local invasive and/or metastatic prostate is a problem whereas the cure for localized-disease is possible, which necessitates diagnosis. The AgNOR staining technique has become a useful instrument in diagnosing tumors, particularly in distinguishing benign from malignant tumours, and in evaluating the aggressiveness of the later. In our study, all tissue samples were embedded in paraffin and routine sections were recut at 3µm thickness before deparafinization and rehydration, and then stained by AgNOR technique. The microscopic images of the cells were recorded in the computer via a video camera. The total AgNOR area/Nucleus area (TAA/NA) values were calculated to compare the AgNOR differences between 8 Benign Prostate Hyperplasia (BPH) as the control group and the 23 prostate cancer patients (7 Grade1, 8 Grade2, 8 Grade3) as the experimental group. The same control and patient groups were evaluated using total AgNOR count/ Nucleus (TAC/N), for the criterion. Cells numbering 100 in each, sample were taken into account and oneway ANOVA was used in the statistical analysis. The mean TAA/NA values of G1, G2, G3 and K groups have been found 5.94±2.41; 7.95±3.66; 8.18±3.42 and 5.81±2.11 respectively. G1-G2, G1-G3, G2-K, G3-K (p<0.001) and G1-K (p=0.003) were significantly different, whereas the difference (between G2-G3) was not statistically significant (p>0.05). TAC/N values in G1, G2, G3 and K groups were 1.27±0.67; 1.36±0.68; 1.47±0.83 and 1.35±0.59; respectively. G2 was not different from K (p>0.05), whereas a significant difference was found between G1-G3, G3-K, (p<0.001) and G1-G2, G1-K,G2-G3 (p<0.05). In conclusion, the eligibility of TAA/NA method in the determination of the difference between the malign and the benign regions makes this method more acceptable in prognostic evaluation.

Key words : AgNOR, prostate CA, benign prostate hyperplasia (BPH)

¹ Bilim Uzm.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy. AD, Kayseri

² Doç.Dr.Erciyes Ün.Tıp.Fak.Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

³ Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp.Fak.Üroloji AD, Kayseri

⁴ Bilim Doktoru.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy.AD, Kayseri

*** Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 02-11-07 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Prostat kanseri (Prostat CA) tüm dünyada giderek büyüyen bir sağlık sorunudur. Prostat kanseri insidansı ve prostat kanserine bağlı mortalite 1970'lerden sonra giderek artmıştır (1). Erkek nüfusunda Prostat CA, tümöre bağlı ölümlerin en yaygın ikinci nedenidir (2). Hastalığın başlangıcı ve doğal seyri sinsidir. Tanı alan bir çok hastada hastalık ya lokal invazyon göstermiş ya da metastatik hale geçmiştir (3).

NOR'lar (Nucleolar Organizer Regions), insanda ve diğer ökaryotlarda kromozom üzerinde "Çekirdekçik oluşturan DNA bölgelerini" ifade ederler (4). NOR'ların gümüş seven (arjirofilik) proteinleri, NOR'larda lokalize genlerle ilişkili, histon olmayan proteinlerdir (AgNORs) (5). Genetik olarak aktif olan NOR'ların gümüş ile boyanabildiği belirlenmiştir. NOR boyama, çeşitli bitki ve hayvan dokularında interfaz ya da hücre döngüsünün herhangi bir evresinde nükleolus (çekirdekçik) oluşturan bölgeleri görülebilir hale getirmek için kullanılan bir boyama tekniğidir. Bu tekniğe "Gümüş boyama (silver staining)" da denir. NOR'larda bulunan bu proteinler gümüş boyama tekniği ile boyandığında hücre çekirdeği içerisinde siyah-kahverengi benekler halinde görülebilmektedirler (5,6). Tümör hücrelerinin proliferatif aktiviteleri arttığında, AgNOR sayısının da proliferatif aktiviteye ilişkin bir parametre olarak arttığı bilinmektedir (5). Ribozomal genlerin gümüş boyanabilirliği ile aktif transkripsiyonel durumları arasında pozitif bir ilişki vardır (5). NOR'ların gümüşle boyanması, ribozomal DNA'nın potansiyel kopyalama aktivitesinin gösterilmesinde kullanılabilir. Dolayısıyla, AgNOR sayılarındaki artış tümör hücrelerinin artışı yansıtır (7). Bu özellik halen malign potansiyeli belirlemek için kullanılmaktadır (8). Malign hücrelerde NOR'lar, çekirdekçiklerden ayrılarak çekirdek içerisine yayılmaya eğilimlidirler (7). AgNOR sayısı-prognoz ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçları çelişkilidir (2,7,9). Malign ve benign lezyonlarda AgNOR'ların tümör klasifikasyonu ve prognoza ilişkin sağlıklı bilgi vermesinin iki boyutlu AgNOR ölçümü ile mümkün olacağını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (10). Öte yandan, bu ilişkiyi ortalama Toplam

AgNOR alanı/çekirdek alanı (Ortalama TAA/ÇA) oranları üzerinden değerlendiren başka bir çalışmaya da rastlanılamamıştır.

Çalışmamızın amacı; Prostat CA hastaları ile Benign Prostat Hiperplazi (BPH)'li hastalarda Ortalama TAA/ÇA ve (Çekirdekte bulunan toplam AgNOR sayısı/çekirdek (TAS/Ç) değerleri açısından bir farklılık olup olmadığını ve bu farklılığın prognoz ile ilişkisini ortaya koymak ve Prostat CA hastalarında prognostik olarak yardımcı olabilecek TAS/Ç değerlerine alternatif daha duyarlı ve güvenilir yeni bir yöntem geliştirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma için 23 Prostat CA'lı hasta (7 Grade1, 8 Grade2 ve 8 Grade3) ve kontrol grubu olarak 8 BPH'lı hastanın patolojik arşiv örnekleri incelenmiştir. Parafin bloklu prostat doku örneklerinden ~3 mm'lik kesitler alınmış ve boyama işlemi sırasında dokuların lamdan düşmemesi için kesitlerin alındığı preparatlar bir gece 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Bunu takiben preparatlara deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri ve gümüş boyama tekniği uygulanmıştır. Preparatlar daha sonra mikroskopta değerlendirilmek üzere entellan ile kapatılmışlardır (11).

Her bir preparattan analiz için uygun olan 100 çekirdeğin görüntüsü ışık mikroskopunda, X1000 büyütmede saptanarak, bir video kamera aracılığı ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Görüntüler, daha sonra değerlendirilmek üzere bitmap türü resim formatında bilgisayara kaydedilmiştir.

Hasta ve kontrollere ait ortalama TAA/ÇA ve ortalama TAS/Ç özel bilgisayar programı (12) kullanılarak değerlendirilmiştir. Programla her bir hücre için, hücre çekirdeğinin alanı ve içerisindeki toplam AgNOR alanı ölçülerek Toplam AgNOR Alanı / Çekirdek Alanı oranı hesaplanmıştır. Her bir hasta ve kontrol için 100'er çekirdek değerlendirilmiştir.

Prostat CA ve BPH olgularının ortalama TAA/ÇA ve TAS/Ç değerleri tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Histolojik derecelendirilmelerine göre gruplandırılmış doku örneklerinin ve kontrol grubunun TAA/ÇA değerleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Hasta ve kontrollere ait NOR alanı değerleri tek yönlü ANOVA testi uygulanarak karşılaştırıldığında; G2-G3 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$) bulundu. G1-G2, G1-G3, G2-K, G3-K ($p<0.001$) ve G1-K ($p=0.003$) grupları ise anlamlı farklılık gösterdi. Tablo I'de K grubundan G3'e doğru giderek yükselen ortalama TAA/ÇA değerleri görülmekle birlikte, Tablo II'den de

anlaşılabileceği gibi G2-G3 grupları istatistiksel olarak farksız bulunmuştur ($p>0.05$).

Histolojik greydlerine göre gruplandırılmış doku örneklerinin ve kontrol grubunun ortalama TAS/Ç değerleri Tablo III' te gösterilmiştir.

Hasta ve kontrollere ait AgNOR sayısı değerleri tek yönlü ANOVA testi uygulanarak karşılaştırıldığında; G2-K ($p>0.05$) grupları farksız bulunurken, G1-G3, G3-K ($p<0.001$), G1-G2, G2-G3 ve G1-K ($p<0.05$) gruplarının anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur (Tablo IV).

Tablo I. Histolojik derecelendirilmelerine göre gruplandırılmış doku örneklerinin ve kontrol grubunun ortalama TAA/ÇA değerleri

Gruplar	N	n	Ortalama TAA/ÇA \pm SD (%)
G1	7	700	5.94 \pm 2.41
G2	8	800	7.95 \pm 3.66
G3	8	800	8.18 \pm 3.42
K	8	800	5.81 \pm 2.11

N: Doku örneği sayısı

n: Değerlendirilen hücre sayısı

Tablo II. TAA/ÇA değerleri açısından gruplar arası karşılaştırmalar (Karşılaştırma için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır.)

Gruplar	TAA/ÇA		
	G2	G3	K
G1	<0.001	<0.001	<0.05
G2		>0.05	<0.001
G3			<0.001

Tablo III. Histolojik derecelendirilmelerine göre gruplandırılmış doku örneklerinin ve kontrol grubunun TAS/Ç değerleri

Gruplar	N	n	Ortalama TAS/Ç \pm SD
G1	7	700	1.27 \pm 0.67
G2	8	800	1.36 \pm 0.68
G3	8	800	1.47 \pm 0.83
K	8	800	1.35 \pm 0.59

N: Doku örneği sayısı. n: Değerlendirilen hücre sayısı.

Tablo IV. TAS/Ç değerleri açısından gruplar arası karşılaştırmalar (Karşılaştırma için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır.)

Gruplar	TAS/Ç		
	G2	G3	K
G1	<0.05	<0.001	<0.05
G2		<0.05	>0.05
G3			<0.001

TARTIŞMA

Tümör patolojisindeki NOR analizlerinin pratik uygulaması, 1986'da NOR'larla ilgili proteinleri belirlemek amacıyla basit argirofilik teknik (AgNOR yöntemi) tanımlandığında başlamıştır (13). AgNOR sayısı, malignansi tanısında patoloğlara yardımcı olan yeni bir araç olarak kabul edilmiştir (13).

NOR'lar bir hücredeki protein sentezinin düzenlenmesinde merkezi öneme sahip olup, büyüklük ve sayıları hem hücrenin çoğalma hızı hakkında bilgi verir hem de malign transformasyon sırasında değişiklik gösterebilir. AgNOR miktarı ve hücre çoğalması arasındaki doğrudan ilişkinin gösterilmesi AgNOR miktarının malign tümörler için etkin bir belirteç olabileceği görüşünü desteklemektedir.

AgNOR analizleri farklı hücre tiplerinin, malign tümörlerin tanısında yararlı bulunmuştur. Gözle değerlendirme yönteminin subjektif ve zaman alıcı olduğu, buna karşılık AgNOR alan analizinin daha objektif ve verimli olduğu ileri sürülmüştür (14,15).

Dechenes ve Weidner (9) hiperplastik ve neoplastik prostat hastalarında; nukleolus çapının, BPH'den karsinomalara doğru, artan AgNOR sayılarına bağlı olarak artış gösterdiğini, AgNOR sayılarının karsinomaların tanısında hiçbir ilave bilgi sağladığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca çekirdekçik çapının BPH'de, G2 ve G3'e doğru sırasıyla sürekli artış gösterdiğini, çekirdekçik çaplarının G3 tümör hücrelerinde BPH'lilerin hücrelerindeki kadar geniş olduğunu ve G2 hücrelerindeki kadar farklı olmadığını istatistiksel olarak göstermişlerdir.

Çalışmamız G2-G3 gruplarını AgNOR alanı yönünden ayıramaması ile Dechenes ve Weidner'in sonuçları (9) ile paralellik gösterse de G1-K ($p<0.05$), G2-K ve G3-K ($p<0.001$) grupları arasında anlamlı farklılığın olması yönünden üstünlük sağlamıştır. Dechenes ve Weidner (9), AgNOR artışını ortalama nükleolus çapı üzerinden değerlendirmiş ve artışın sürekli olduğunu göstermişlerdir. Bizim sonuçlarımızda da aynı artış gözlenmektedir. Daha büyük sayıda örneklerle yapılacak çalışmaların farkı daha belirginleştirmesi beklenebilir.

Bazı araştırmalar (2,16-22), hücreler üzerinde gümüş boyama tekniğinin; benign ve malign tümörler arasındaki farkı ve iyi, orta ve kötü diferansiye karsinomalar arasındaki dağılımı belirlemeye yardımcı edebileceğini gösterirken, bu görüşü desteklemeyen çalışmalara da rastlanılmaktadır (7).

Pavlakıs ve arkadaşlarının (21) benign ve malign prostatik bölgelerdeki lezyonlarda, ortalama AgNOR sayısının, BPH'dan Prostat CA'ya doğru sürekli artış gösterdiğini ve G1, G2 ve G3 arasında anlamlı farklılığın olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda her ne kadar G2-K gruplarını istatistiksel olarak ayıramamış olsa da, G1'den G2 ve G3'e doğru sürekli artış istatistiksel olarak gösterilmiştir (Tablo 3).

Alan ve Schned (7) NOR sayılarının tanı amaçlı kullanılıp kullanılmayacağını araştırmış, toplam malign ve benign gruplarına ait Ortalama AgNOR sayılarında çakışmalar bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada da G2-K gruplarını istatistiksel olarak ayıramamamızın nedeni aynıdır. G2 ve K grubu sayı ortalamaları birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur. Bu duruma doku kesitindeki hücrelerin üst üste gelmesinin, NOR'ların birleşme eğiliminde olmasının ve sayım metodunda bir standardizasyonun bulunmayışının neden olduğu düşünülmektedir. Sağlanabilen hasta sayısının yedi kişiyle sınırlı kalması, K grubu ortalama TAS/Ç değerinin G1 grubundakinden yüksek bulunmasına yol açmış olabilir. AgNOR miktarının değerlendirilmesinde halen kullanılan iki yöntem; AgNOR noktalarının sayılması ve AgNOR alan/alanlarının analizidir. AgNOR noktalarının sayılması yalnızca zaman

alıcı değil aynı zamanda gözlemci hatalarına da izin veren bir yöntemdir. AgNOR sayımı ile karşılaştırıldığı zaman AgNOR alanının ölçülmesinin daha güvenilir ve daha verimli bir yöntem olduğu gösterilmiştir. İn vitro çalışmalar, ortalama AgNOR alanı ve sayılarının çeşitli tümörlerde diferansiyasyon derecesi ile pozitif korelasyonunu göstermiştir. AgNOR alanı ve türevlerinin, AgNOR sayısına göre hücresel çoğalma hızını daha iyi ortaya çıkardığı ve malignansı da daha güvenilir bir şekilde gösterdiği bulunmuştur (14,15). Elde ettiğimiz sonuçlar da bu görüşü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, Ortalama TAA/ÇA değerleri prognostik değere sahip görünmekte ve bilgisayarda değerlendirme yöntemi bireysel gözlem farklılıklarını azaltarak gerçeğe daha yakın bilgi sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kırkalı Z, Erözenci A, Prostat Kanseri Etyoloji ve Epidemiyoloji, Prostat Kanseri Güncel Yaklaşımlar Seminer Notları, İstanbul 1997, ss 42-49.
2. Mukaherjee J, Misra V, Gupta SC, Gupta AK, Tandon SP. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Atypical Adenomatous Hyperplasias, Prostatic Intraepithelial Neoplasias and Prostatic Neoplasms. Urol Int 1997, 58:75-79
3. Kırkalı Z, Gleason Grading Sistem- Tümör Volümü ve Prognoz İlişkisi, Prostat Kanseri Güncel Yaklaşımlar Seminer Notları, İstanbul 1997,ss 51-67.
4. Bloom SE, Goodpasture C An Improved Technique for Selective Staining of of Nucleolar Organizer Regions in Human Chromosomes. Hum Genet 1976, 34:199-206.
5. Shiina H. et al. Comparison of ureteropelvic transitional cell carcinoma using an image analyzer. Urology Internationalis. 1996, 56: 163-168.

6. Ünlü-Akalın H, Alzheimer Hastalarının Lenfositlerinde rRNA İfadeleşmesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2003.
7. Alan R, Schned MD. Nucleolar Organizer Regions as Discriminators for the Diagnosis of Well-Differentiated Adenocarcinoma of the Prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1993, 117:1000-4.
8. Tomobe M. et al. Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value local recurrence in superficial bladder tumor. *J Urol* 1999,162: 62-68.
9. Deschenes J, Weidner N. Nucleolar Organizer Regions (NOR) in Hyperplastic and Neoplastic Prostate Disease. *The Am J Surg Pathol* 1990, 14: 1148-55.
10. Jinz S. et al. AgNOR staining of cell imprint preparations of human bladder cancer. *Acta Cytology*. 1996, 40(6): 1159-64
11. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft J.D, Stevens A, Turner D.R. Churchill Livingstone Edinburg, London, Melbourne and New York 1990, 3: 61-75.
12. Kara S, Cücer N, Saraç F, İmamoğlu N. Sağlıklı Down sendromlu çocuklarda AgNOR alanlarının analizi, *Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı Bildiriler Kitabı, BİYOMUT, İstanbul, 27-29 Mayıs 2004, TÜRKİYE*; ss 253-255 Editörler: Yorgo İstefanopulos, H.Özcan Gülçür. Boğaziçi Üniversitesi Matbaası.
13. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000, 31: 133-141.
14. Wai Pak M, Fai To K, Huai Chen M, Yuen Lo S, Kuen Lam P et al. Morphometric Analysis of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Nasopharyngeal Carcinoma. *Head Neck* 2000, 22: 760-64.
15. Chen Maohuai MD, CK Lee J, Lo S et al. Argyrophilic Nuclear Organizer Regions in Nasopharyngeal Carcinoma and Paraneoplastic Epithelia. *Head Neck* 2003, 25: 395-99.
16. Williams PL, Warwick R, Dyson M, et al; *Gray's Anatomy*. Churchill Livingstone, Edinburg 1989, pp 1433-1435.
17. Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N, Anafarta K, Temel Üroloji, 1998,pp 20-22, 726-751.
18. Troncosa P, Ro J: *Prostate Gland in Livolsi VA. (ed.) Major Problems in Pathology, Volume 28, WB Saunders, Philadelphia* 1993, pp 363-383.
19. Sadler TW: *Medical Embriology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1990, pp 270-290.
20. Kendi S, *Prostat ve Hastalıkları*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları-Ankara 1980, ss 1-20, 37-77.
21. Pavlakis K, Alivizatos G, Mitropoulos D et al. Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions in Benign and Malignant Prostatic Lesions. *Urol Int* 1992, 49:137-140.
22. Mamaeva S, Lundgren R, Elfving P et al. AgNOR Staining in Benign Hyperplasia and Carcinoma of the Prostate. *The Prostate*. 1991, 18: 155-162.

