

Merkez sinir sistemi tümörlerinin intraoperatif tanısında imprint yönteminin önemi

The significance of touch technique in intraoperative diagnosis of central nervous system tumors

Nagihan Çolakoğlu¹ M. Şerefettin Canda² Tülay Canda²

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Kınıklı-Denizli

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

Özet

Giriş ve amaç: Smear tekniği, beyin cerrahisinde intraoperatif tanı ve stereotaktik biyopsilerin incelenmesinde önemlidir. Amacımız, merkez sinir sistemi (MSS) lezyonlarında imprint ve "squash" (ezme) preparatları frozen ve parafin kesitlerle karşılaştırmak, sitolojik özelliklerini, intraoperatif tanıya katkılarını, ayrıca imprint preparatlarda DNA içeriği ile AgNOR değerinin yararını araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: MSS biyopsilerinden frozen yapılan olguların 97'sine imprint, 19'una imprint ve "squash" preparat yapıldı, tümü H+E ve PAP ile, 53'ü gallocyanin chromalum, 28'i de AgNOR ile boyandı. Dizideki olgularımız, 36 glial tümör, 20 meningiom, 6'şar schwannoma ve hipofiz adenomu, 3 kraniofaringiom, 2 hemanjioblastom, 1'er medulloblastom, gangliogliom ve lipom, 14 metastatik tümör, 5 non-neoplastik lezyon ve 2 normal beyin içermektedir.

Bulgular: DNA içeriği saptanan 53 olgunun kontrol grupları ile karşılaştırılmasında, glial tümörler ile metastatik karsinomlarda kontrol gruplarına göre, istatistiksel olarak, anlamlı bir yükselme izlendi. AgNOR değeri saptanan 28 olgunun, tümör gruplarının kontrollerle karşılaştırılması, istatistiksel anlamlı bulunmadı.

Sonuç: İmprint yöntemi, özellikle küçük, ödemli, yumuşak dokularda ve dokunun parafin kesitler içinde saklanması gerektiğinde en iyi intraoperatif tanı yöntemidir, sınır lezyonların değerlendirmede yetersizdir. Schwannoma ve kraniofaringiomun imprintleri hiposellüler olduğundan, intraoperatif tanıda, öncelikle frozen kesitle değerlendirme yapılmalıdır. İmprintlerle birlikte frozen doğru tanı olasılığını artırır. Ayrıca imprint preparatta DNA içeriği ölçülebilir ve AgNOR değeri saptanabilir.

Anahtar sözcükler: İmprint preparat, "squash" (ezme) preparat, merkez sinir sistemi tümörleri, intraoperatif tanı, DNA, AgNOR.

Summary

Objective: The smear technique plays an important role in the analysis of stereotactic biopsy in neurosurgery. The aim of this study, is to compare touch and squash preparations of central nervous system (CNS) lesions to their frozen and paraffin section counterparts by means of cytological features and their contribution to intraoperative diagnosis. In addition the benefits of touch preparation in the determination of DNA content and AgNOR count have been evaluated.

Materials and methods: Touch preparations in 97 cases which have been submitted for intraoperative diagnosis of CNS biopsies and both touch and squash slides in 19 cases were examined. All touch slides stained with H&E, PAP. 53 of all touch preparations stained with gallocyanin chromalum and 28 of all touch preparations are stained with AgNOR. Our cases consist of 36 glial tumours, 20 meningioma, 3 craniopharyngioma, 6 pituitary adenoma, 1 medulloblastoma, 1 ganglioglioma, 2 hemangioblastoma, 1 lipoma, 14 metastatic tumours, 5 nonneoplastic and 2 normal brain tissues.

Results: Touch preparations of schwannoma and craniopharyngioma cases were hypocellular. DNA content which has been investigated in 53 cases, found to be higher than glial tumors and metastatic tumors when compared to control groups. AgNOR count has been determined in 28 cases and there were no statistical significance when compared with the control groups.

Conclusion: Imprint is the best technique in the intraoperative diagnosis of small, oedematous, soft tissues and when tissues need to be preserved in paraffin blocks. Touch technique is insufficient in the evaluation of borderline lesions. Touch preparations of schwannoma and craniopharyngioma cases were hypocellular. Therefore they should be evaluated by frozen section for intraoperative diagnosis. Touch preparation and frozen section combination increases the possibility of correct diagnosis. In touch preparation technique DNA content can be measured and AgNOR count can be determined. In addition touch preparations are helpful in the evaluation of paraffin sections.

Key words: Touch (imprint) preparation, squash preparation, central nervous system tumors, intraoperative diagnosis, DNA, AgNOR

Cerrahi doku örneklerinde, intraoperatif imprint (dokundurma, basma) sitolojisi, eskiden beri uygulanan, frozen yöntemine yardımcı bir uygulamadır, tanısal değeri güncel olarak artmıştır. Örneğin, benign ve malign lezyonların ayırımında frozen kesitlerinden daha çok bilgi verir (1-5). Frozen kesitler, kalıcı kesitlere daha çok benzediğinden, imprintten üstün tutulursa da, nöroşürürijide stereotaktik biopsi ile smear preparatın önemi artmıştır (6,7). Çok küçük dokularda smear, en iyisidir, örneğin parafin kesit, sitolojiden daha çok bilgi veremez (7).

Patolog, gerek hızlı tanı ve gerekse parafin kesit inceleyen lezyonun lokalizasyonunu, cerrahi gözlemi, ön tanıyı, radyolojik bulgu ve ayırıcı tanıyı bilmelidir (6).

İmprint sitolojisinin üstünlüğü, sakıncasından çoktur (4,6, 8,9). Beyin biyopsilerinde, hızlı tanıdaki doğruluk oranı, frozen kesitlerde %90 ve smearlerde de %83-95 dir (6, 10,11).

Hipofiz adenomlarında, imprint güvenilir ve hızlı tanı sağlar. Doku örneği 1-3 mm ise, imprint intraoperatif tanıda en iyi yöntemdir, parafin kesit ve immün dokukimya (İDK) için de doku geriye kalır (12). Sitolojik olarak, glial tümörlerde malignite belirlenir, ancak derecelendirme güçtür (13). Nöropatoloji laboratuvarında, frozen ve parafin kesitlere ek olarak smear uygulanır. İmprint ya da "squash" (ezme) preparat frozen ile maskelenen sitolojik ayrıntıyı gösterir (1,2,7,14).

Stereotaktik biyopsi, tümörün sınırının belirlenmesini, intakt beyin parankimine infiltre ya da izole tümör hücrelerinin saptanmasını kolaylaştırır. Smear tekniği, intraoperatif tanıdaki katkısı yanısıra, histolojik kesitleri de tamamlayıcıdır (15). Sitolojik preparatın üstünlüğü, hücrel ayrıntının iyi okunması, daha çok biyopsinin hızlı incelenmesi, İDK'sal ve diğer biyokimyasal belirleyicilerin uygulanabilmesidir (16-19).

AgNOR yöntemi, parafin kesitler ile sitolojiye uygulanabilir (20,21-24). Sitolojide AgNOR tanecikleri, daha çok ve daha iyi görülür, nükleuslar tek tek düşer, tüm nükleus alanı görülür, komşu hücredeki AgNOR kolaylıkla ayırılabilir (20,24). Stereotaktik biyopsi smearlerinde, proliferatif potansiyeli belirlemek için AgNOR yöntemi yapılır (24). AgNOR sayısı, tümörün proliferasyon hızıyla orantılıdır. İntrakranial tümörlerin smearlerinde AgNOR proliferatif kapasite belirleyicisidir (25,26).

Astrositomlarda sitomorfik DNA ölçümü, yalın histolojik ölçütlerden daha güvenlidir (27,28). Örneğin, erişkinde yaşam süresiyle astrositomların ploidi düzeyleri ilişkilidir (29). DNA miktarı mikrospektrofotometri (statik sitometri) ve flowsitometri (akım sitometrisi) ile ölçülür (30,31).

Mikrospektrofotometrik DNA ölçümü feulgen (28,32,33) ve galloccyanin chromalum (34,35) boyalarıyla yapılır. Arşivdeki smearler soldurulup yeniden boyanarak DNA içeriği saptanır. Yine imprint ve ince iğne smearlerinde, alkolde fikse ya da havada kurutulmuş olsun, yıllar sonra da DNA içeriği saptanabilir (32). Taze doku istememesi, çok küçük doku ve imprintlerde çalışılabilmesi (36), nükleusların seçilerek tek tek sayılması üstünlükleridir (32).

Amacımız, MSS tümörlerinde sitolojik tanının öneminin giderek artması nedeniyle, frozen için gelen MSS biyopsilerinin imprint ve "squash" preparatlarını, parafin ve frozen kesitlerle karşılaştırıp sitolojik tanı ve ayırıcı tanı özelliklerini araştırmak; ayrıca bunlarda DNA içeriği ve AgNOR sayısının yararını belirlemektir.

Gereç ve yöntem

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na, 1993-95 yıllarında frozen için gelen 97 MSS biyopsisinde frozen yanısıra imprint ve yeterli materyal olan 19 olguda imprint ve "squash" preparat yapıldı. Her olgudan 2-6 adet preparat, alkolde işleme alındı, H+E ve PAP ile boyandı. Sitolojik bulgular frozen ve histolojik kesitlerle karşılaştırıldı. Bunların 53'ünde DNA içeriği, 28'inde AgNOR değeri saptandı.

Taze dokunun kurutma kağıdıyla dehidrasyonu sağlandı, lam üzerine dokundurularak imprint (dokundurma) preparat yapıldı. Materyalin bol olduğu 19 olguda, doku iki lam arasına bastırılarak "squash" (ezme) preparat yapıldı. Bunlar, hemen %95 etil alkolde en az 30 sn tutuldu, hemotoksilen eozin (H+E) ve Papanicolaou ile boyandı. Kalanlar kurutulup AgNOR ve galloccyanin chromalum için ayrıldı. 53 olgunun imprintleri ile kontroller (2 otopsinin beyin ve serebellumuna ait 4 imprint) galloccyanin chromalum ile boyandı. Galloccyanin chromalum, hem DNA hem RNA boyadığından, yalnız DNA'yı göstermek için RNA uzaklaştırıldı.

Galloccyanin Chromalum boyama yöntemi (34):

Boyanın hazırlanması: Chromium potasyum sülfat ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5 gr, distile su 100 ml, galloccyanin "National Aniline No:432" 1.02 gr. karıştırıldı, ısıtıldı, 5 dakika kaynatıldı, oda ısısında soğutuldu, filtre kağıdıyla süzülürdü. Süzülen boyaya 100 ml. oluncaya dek distile su eklendi, pH'ı, pHmetre ile ölçülüp hidroklorik asit eklenerek, 1.64'e ayarlandı ve boyama işlemi yapıldı:

Alkol dizileri, saf su,

%10 perklorik asit, 37 derece etüv, 15 dakika,

Oda ısısında soğutma, distile su,

%1 sodyum karbonat eriyiğinde, 5 dakika oda ısısında, saf su,

Gallocyanin chromalum, 48 saat, oda ısısında, distile su, %95 etil alkol, absolu alkol, ksilolden geçirilir, Entelan ile kaplanır.

Mikrospektrofotometrik ölçüm: Austria Nr 352958 marka mikroskop (E.Ü.F.F. Biyoloji Bölümü) kullanıldı. Tüm preparatlar karanlık odada 550 dalga boyunda 40X objektif ile değerlendirildi. 2 otopsinin beyin ve beyinciğinden yapılan 4 imprint, kontrol olarak kullanıldı. Hipofiz adenomlarının kontrolü için 4 erişkin otopsisinin hipofiz imprintleri alındı. Her lamda 100 hücre nükleusunda DNA miktarı ölçüldü. Her kontrol imprintde 100 hücredeki DNA miktarı, söndürme (extincton) değeri olarak ölçüldü.

Her olguya ait 100 hücrenin DNA içeriğinin ortalaması ve o olgunun ortalama DNA değeri bulundu. 28 olguya ait yayma preparatlara AgNOR yapıldı.

AgNOR boyama yöntemi:

AgNOR'un hazırlanışı: Eriyikler: I. 100cc distile su, 2 gr jelatin ateşte eriyene dek karıştırıldı ve üzerine 1cc

formik asit eklendi. II. 100 cc distile su, 50 gr AgNO₃ ile eritildi ve aliminyum kağıtla örtüldü. Çalışma eriyiği; 1 hacim I. eriyik ile 2 hacim II. eriyik karıştırılarak, taze hazırlandı ve boyama işlemi yapıldı:

Alkol dizileri, saf su,
Çalışma eriyiğinde 45 dk karanlık odada,
Distile suya 4-5 kez batırılır,
Alkol dizilerinden geçirilir,
Entelan ile kaplanır.

Her imprintte immersiyon ile 100X büyütmede, 100 hücrede AgNOR tanecikleri sayıldı. Toplam AgNOR sayısı 100'e bölündü, her olgunun ortalama AgNOR değeri bulundu. Sonuçlar, istatistiksel olarak, Mann-Whitney U testiyle değerlendirildi.

Bulgular

Olguların 29'u astrositom, 4'ü oligodendrogliom, 1'i oligoastrositom ve 2'si ependimom olmak üzere toplam 36'sı glial tümördü. Ayrıca AgNOR ve DNA içerikleri belirlendi (Tablo I, II).

Tablo I. Kontrol grubu, glial, metastatik tümörler ve hipofiz adenomunun DNA değerleri.

Olgu sayısı (n)	Histolojik Tanı	DNA içeriği	Olgu sayısı (n)	Histolojik Tanı	DNA içeriği
Kontrol	Beyin	0.1259		Meningotelial	
Kontrol	Beyincik	0.1309	31	Menengiom	0.1301
Kontrol	Beyin	0.1356	32	Menengiom	0.1864
Kontrol	Beyincik	0.1676	33	Menengiom	0.1461
	Glial		34	Menengiom	0.3359
1	GBM	0.2160	35	Menengiom	0.2579
2	GBM	0.1626	36	Menengiom	0.1637
3	GBM	0.1880	37	Menengiom	0.1964
4	GBM	0.2843	38	Menengiom	0.2680
5	GBM	0.2021	39	Menengiom	0.3016
6	GBM	0.2124	40	Menengiom	0.2728
7	GBM	0.4448			
8	GBM	0.2283		Periferik sinir	
9	GBM	0.1083	41	Schwannoma	0.1924
10	GBM	0.2002	42	Schwannoma	0.1823
11	GBM	0.2666	43	Schwannoma	0.1432
12	AA	0.2738	44	Schwannoma	0.2858
13	DDA	0.1484			
14	DDA	0.2062		Orijini belli olmayan	
15	DDA	0.2408		Hemangioblastom	
16	AO	0.2183	45		0.3050
17	OA	0.1449			
18	ME	0.3734		Diğer	
19	SE	0.2541	46	Abse	0.2478
	Embriyonel		47	Serebrit	0.3657
20	Medulloblastom	0.2679	48	Radyonekroz	0.3219
	Metastatik				
21	Karsinom	0.3420		Hipofiz	
22	Karsinom	0.2944		Kontrol	0.1497
23	Karsinom	0.4596		Kontrol	0.1300
24	Karsinom	0.3500		Kontrol	0.1439
25	Karsinom	0.3245		Kontrol	0.1652
26	M. Melanom	0.5987	49	Adenom	0.2213
27	Karsinom	0.1745	50	Adenom	0.1622
28	Karsinom	0.3550	51	Adenom	0.3164
29	Karsinom	0.2129	52	Adenom	0.4850
30	Karsinom	0.2838	53	Adenom	0.1956

GBM: Glioblastoma multiforme, AA: Anaplastik astrositom, DDA: Düşük dereceli astrositom, AO: Anaplastik oligodendrogliom, OA: Oligoastrositom, ME: Miksopapiller ependimom, SE: Sellüler ependimom, PAK: Papiller adenokarsinom.

Tablo II. Olguların AgNOR değerleri.

Olgu sayısı n)	Histolojik Tanı	AgNOR değeri
	Kontrol	2.54
	Kontrol	2.68
	Kontrol	3.04
	Glial	
1	GBM	4.61
2	AA	3.79
3	GBM	3.18
4	AA	2.10
5	DDA	3.48
6	Oligo	2.06
7	S E	3.99
	Embryonel	
8	Medullo	3.84
	Metastatik	
9	Karsinom	4.36
10	Karsinom	5.81
11	Karsinom	5.61
12	Karsinom	2.79
13	Karsinom	3.31
	Meningotelial	
14	Meningiom	2.94
15	Meningiom	1.74
16	Meningiom	3.36
17	Meningiom	3.85
18	Meningiom	3.33
19	Atipik meningiom	2.91
20	Malign meningiom	4.68
	Schwann hücresi	
21	Schwannoma	2.27
22	Schwannoma	2.26
	Diğer	
23	İnfahtüs	3.56
24	Radyonekroz	1.17
	Hipofiz	
	Kontrol	2.81
	Kontrol	1.94
	Kontrol	1.86
	Kontrol	2.67
25	Adenom	2.72
26	Adenom	2.78
27	Adenom	1.58
28	Adenom	1.11

Astrositomların (29 olgu, %29.9) 2'si pilositik (derece 1), 2'si derece II, 25'i derece III astrositomdur.

Glioblastom (19 olgu) imprintlerinde; nükleuslar belirgin pleomorfikti. Büyük ve küçük nükleuslu hücreler vardı (Resim 1). Büyük hücrelerin sitoplazma uzantıları, yer yer fibriler zemin, kanama, nekroz ve nötrofiller vardı (Resim 2). Olguların 3'ünde mitoz, 11'inde nekroz, endotel proliferasyonu, ayrıca 2'sinde pimentli makrofajlar vardı. Anaplastik astrositomların sitolojik özellikleri, nekroz dışında GBM ile aynıdır. Pilositik astrositomda (2 olgu, %2.1) oval, iğsi nükleuslu, ince uzun eozinofilik si-

toplazmalı hücreler görüldü. Diğer düşük dereceli astrositomlarda; zeminde fibriler yapı, sellülarite hafif artmış, nükleer membranlar düzensiz ve kromatinin hafif kaba idi (Resim 3).

Oligodendrogliom (4 olgu, %4.1) imprintlerinde hipersellülarite, hafif pleomorfizm, üniform, yuvarlak nükleuslu hücreler ve fibriler zemin ile sitoplazmada vakuol ve perinükleer halo vardı. Oligoastrositomda; küçük, üniform hücreler, kalsifikasyon ve zeminde fibriler materyal vardı.

Ependimomun (2 olgu, %2.1) 1'i sellüler, diğeri mikso-papiller ependimom olup, sellüler ependimomda, hipersellülarite, fibriler sitoplazmalı, kondanse ve belirgin epitelial yanaşma gösteren hücreler vardı. Nükleuslar iğsi, ince kromatinli, düzenli nükleer membranlı, nükleoller içermekte (Resim 4) ve çok sayıda rozet vardı. Mikso-papiller ependimomda; merkezde metakromatik homojen materyal ve çevresinde iğsi uzantılı fibriller vardı. Glial tümörlerde (19 olguda) kontrollere göre DNA içeriğinde istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p < 0.005$). Glial tümörlerde (7 olguda) AgNOR değerlerinin ortalamasıyla kontroller arasında, istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Medulloblastom imprintlerinde hipersellülarite, oval, kaba granüler kromatinli nükleus, belirsiz sitoplazma ve merkezinde fibriler materyal olan rozetler, tek hücre nekrozu ve mitoz görüldü (Resim 5).

Gangliogliom (1 olgu) imprintinde fibriler zemin, glial hücreler, pleomorfik multinükleer ganglion hücreleri vardı.

Dizideki olguların 20 (%20.1)'si histolojik olarak meningiom idi (11'i transisyonel, 3'ü fibroblastik, 3'ü meningotelial, 1'i psammomatöz, 1'i atipik, 1'i malign meningiom). Bunların AgNOR sayıları ve DNA içeriği bulundu (Tablo I, II). Tipik meningiomların sitolojisinde oval, iğsi nükleuslu, üniform, poligonol sitoplazmalı hücreler vardı. Nükleuslar ince kromatinli, sitoplazma nükleusunun bir ya da iki ucunda uzanır ve deste biçimindedir. Olguların 5 (%25)'inde düğüm "whorl" yapısı, 3 (%15)'ünde psammom cisimi vardı (Resim 6).

Atipik meningiomda, hiperkromatik nükleuslu, az sayıda hücre izlendi. Malign meningiomda, belirgin pleomorfik, nükleollü anaplastik hücreler vardı ve AgNOR sayısı, diğerlerinden belirgin yüksekti (Tablo II).

Schwannoma (6 olgu) imprintleri hiposellülerdi, değişik yoğunlukta, pembe granüler ya da ipliksi matriks üzerinde, seyrek büklümlü, iğsi ve yuvarlak nükleuslu, sitoplazma sınırı belirsiz hücreler vardı.

Hipofiz adenomunda (6 olgu) imprintler sellülerdi. Matriksi olmayan, yer yer kopmuş, tek tek, sitoplazması köşeli hücrelerin nükleusları yuvarlak, nükleer membran-

ları düzenli ve nükleoller belirgindi, yer yer pleomorfizm ve binükleasyon vardı, damar endotelleri boldu. Olguların 5'inde DNA içeriği saptandı (Tablo I) ve kontrolleriyle karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.005$). AgNOR değeri 4 olguda saptandı (Resim 7) (Tablo III), kontrollerle karşılaştırıldı, anlamlı bir yükselme saptanmadı ($P > 0.05$).

Non neoplastik 5 olgudan (2 abse, birer olgu serebrit, radyonekroz ve mikroenfarktüs), absede çok sayıda makrofajlar, plazmositler, PNL ve nekroz vardı. Olguların birinde DNA ölçüldü ve 0.2478 olarak bulundu.

Serebrit sitolojisinde fibrinli zemin, plazmositler, lenfositler ve seyrek glialar vardı, bunlarda DNA miktarı 0.3657 bulundu.

Beyin mikroenfarktüsünde, glial hücreler hafif artmıştı. Radyonekroz sitolojisinde mikrokistik zemin, hafif artmış ve dejenere glialar vardı. Bunların kromatin yapıları ince granüler ve nükleer membranları düzenlidir, olgunun radyoterapi aldığı bilinmesi ve tümör hücresinin yokluğu tanıda önemlidir.

Kraniofaringioma (3 olgu) imprintleri hiposellülerdi. Bir kaç alanda skuamoid dizimli epiteller izlendi.

Hemanjioblastom (2 olgu) da, kanama alanları içinde hiperkromatik nükleuslu hücreler izlendi. Parafin kesitlerinde İDK'sal ve dokukimyasal işlemlerle metastatik renal hücreli karsinomdan ayırıcı tanısı yapıldı, imprint ile tanıya ulaşmak güçtür.

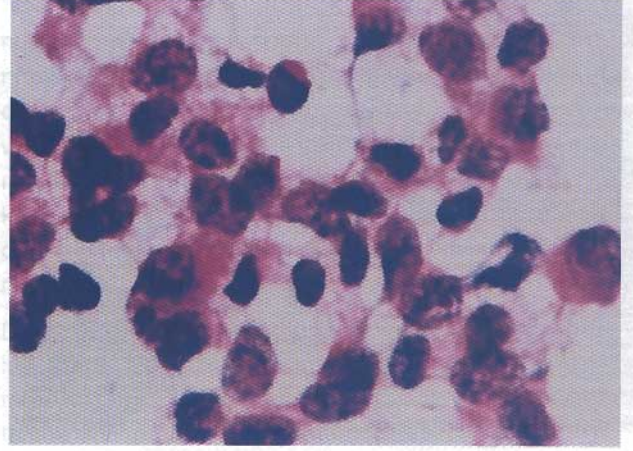
Korpus kallosum lipomunun imprintlerinde matür yağ dokusu hücreleri vardı.

Metastatik karsinom 14 olgu idi (5 adenokarsinom, 1 bronkioloalveoler karsinom, 1 malign melanom, 1 küçük hücreli karsinom, diğerleri indiferan metastatik karsinom). Adenokarsinomlarının imprintleri hipersellülerdi, pleomorfik kaba kromatinli, nükleolü belirgin hücreler papiller (Resim 8) ve adenoid yapılar yapmıştı.

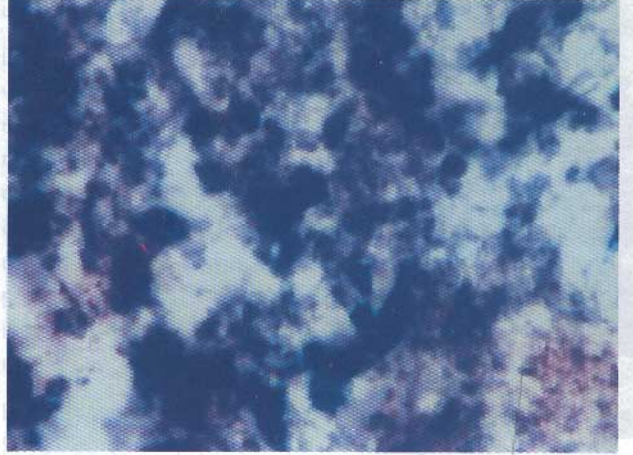
Malign melanom olgusu, diğerlerinden daha genç idi ve önceden anüste malign melanom tanısı vardı. İmprint ve ezme preparatlarında hipersellülarite ve epitelial yavaşma izlendi. Bunlarda pleomorfizm, nükleuslarda pseudoinklüzyon ve melanin pigmenti vardı (Resim 9).

İndiferan karsinomda (3 olgu) solid ya da pseudoadenoid yapıda dar sitoplazmalı, pleomorfik hücreler epitelial yavaşma göstermekte idi. Epitelyal yavaşma izlenmeyen olgu "malign tümör" tanısı aldı.

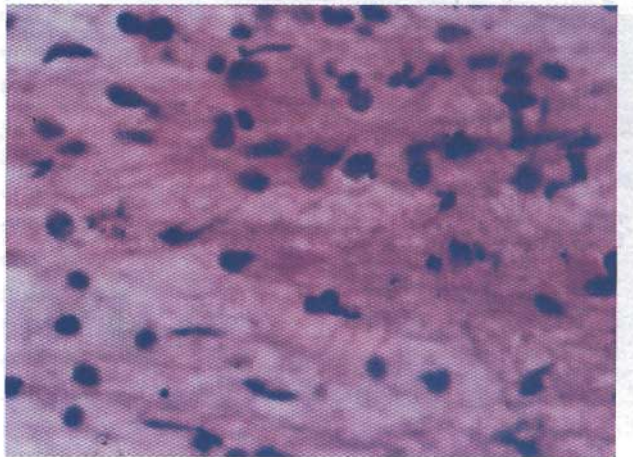
Metastatik karsinomlu 10 olgunun DNA değerleri ölçüldü (Tablo I). Bunlar kontroller ile karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı ($P < 0.01$). Olguların 5'inde AgNOR değeri sayıldı (Tablo II). Kontroller karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı yükselme bulunmadı ($P > 0.05$).



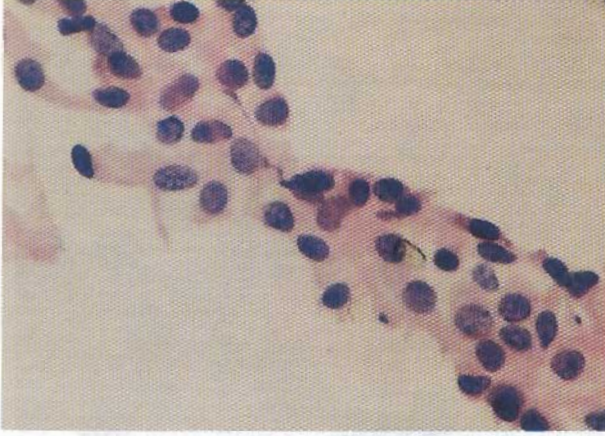
Resim 1. Glioblastom multiforme; pleomorfik, kaba nükleer kromatinli, sitoplazmik uzantılı hücreler (1101/94, H+E X400).



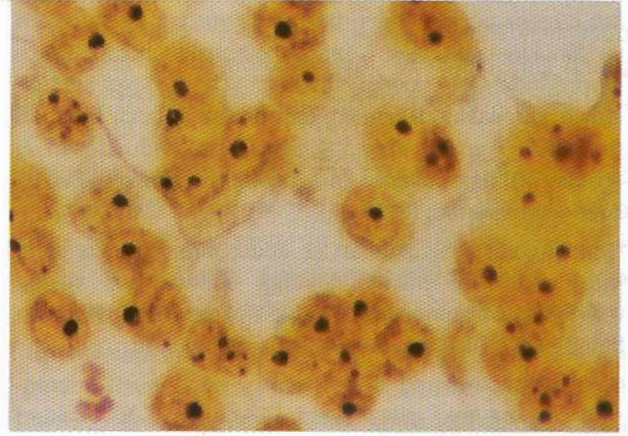
Resim 2. Glioblastom multiforme; nekroz alanları (12860/94, H+E X400).



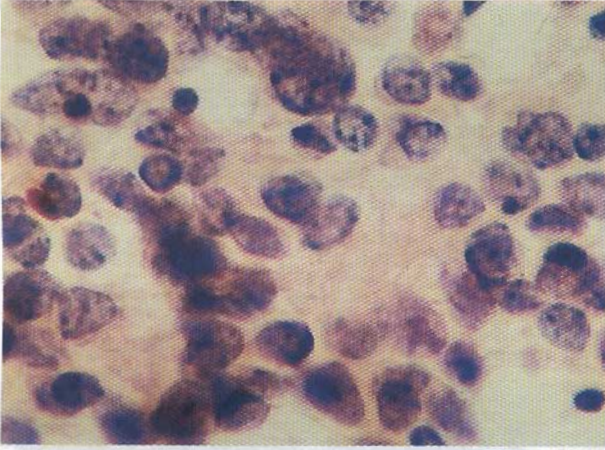
Resim 3. Düşük dereceli astrositom; fibriler zemin ve hafif pleomorfik hücreler (7066/93, H+E X200).



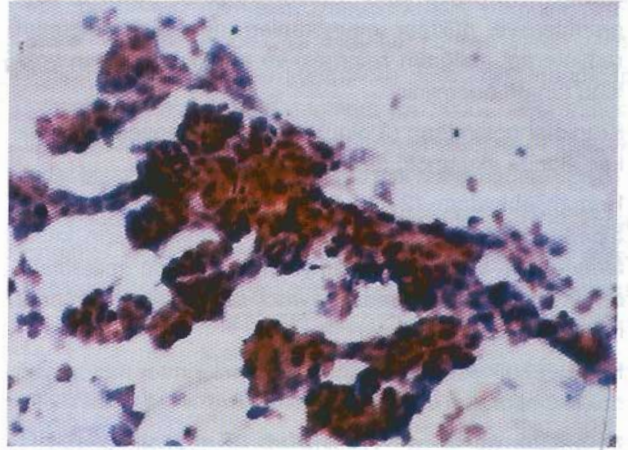
Resim 4. Sellüler ependimom, nükleer membranları düzenli, sitoplazmaları kondanse ve epitelyal yanaşma gösteren hücreler (1820/95, H+E X200).



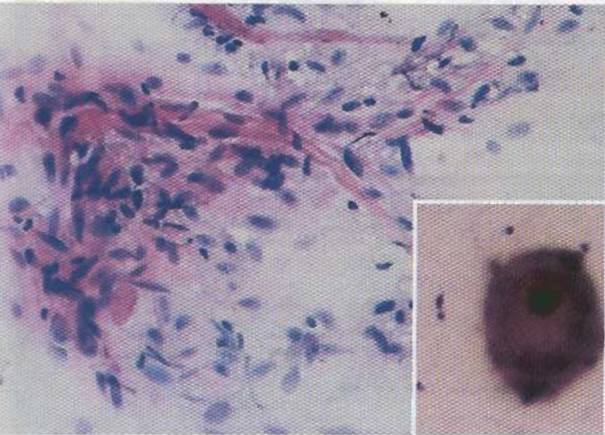
Resim 7. Hipofiz adenomunda AgNOR tanecikleri (2474/95, X400).



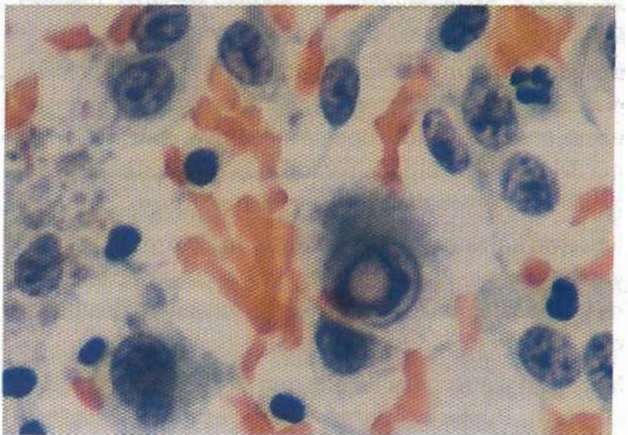
Resim 5. Medulloblastom; yuvarlak, oval nükleuslu, kaba granüler kromatinli, sitoplazma sınırı belirsiz hücrelerin oluşturduğu merkezinde fibriler materyal olan rozet yapısı (4378/93, H+E X400).



Resim 8. Metastatik papiller adenokarsinom; papiller yapı ve epitelyal yanaşma gösteren hücreler (6170/94, PAP X100).



Resim 6. Meningiom; üniform, oval, iğsi nükleuslu hücreler (11215/93, H+E X200) ve psammom cismi (12453/93, H+E X100).



Resim 9. Metastatik malign melanom; intranükleer pseudoinklüzyon (2837/95, PAP X400).

Tartışma

Doku çok küçük, yumuşak, ödemli olduğunda, imprint yöntemi daha başarılı olup, intraoperatif tanıda tek başına kullanılır (8,14). İmprint ile tanıya ulaşamadığında, frozen önerilir (6). Örneğin, bu dizideki 20 menenjiomda yalnız 1 olguya karşın, schwannoma gibi daha sert dokularda 3 olgudan 1'i tanısız değildi, hipofiz adenomu olgularımızın tümü, imprint ile doğru tanı almıştı. Çok küçük dokunun yeterli olması, sitoplazmik ve nükleer özelliklerin korunması, kısa süre alması, imprintin üstünlükleridir (6,8). İmprintler, ayrıntılı incelemede, ipuçları verirse de genelde tümörün yapısal özellikleri açısından kısıtlı olması, tanıda güçlük yaratır. Pinealoblastomda rozetler, meningiomlarda "whorl" yapısı tanıda yardımcıdır (6). Örneğin, meningiomların 5(%25)'inde "whorl", 3(%15)'ünde psammom cisimi vardı

Medulloblastom imprintlerinde, merkezinde fibriler materyal bulunan rozet yapısı saptadık. Medulloblastom için özgün rozet görülmesi, malign lenfoma (ML) ve serebellum granüler tabaka hücrelerinden ayırımı kolaylaştırır. Granüler tabaka hücrelerinde, arada Purkinje hücreleri, düzenli nükleer membran, ince kromatin yapı, ayırımı sağlar (10). Malign lenfomada, ince kromatinli, nükleolü, veziküle, yuvarlak nükleuslar görülür, medulloblastomda ise nükleuslar ML'dan küçük, yoğun ve üniform kromatin içerir (6,37).

Yumuşak tümörlerin imprinti, sertlerden daha iyidir (9, 17). Damar proliferasyonu varsa, örneğin glioblastomda, imprintler daha kalın olur. Yüksek dereceli gliomların (25 olgu) nekrozlu olguların (11 olgu) imprintleri de, göreceli kalındır, sitolojide güçlük yaratır.

Büyük, sert, fibröz dokuların intraoperatif tanısında, frozen daha uygundur, çünkü bunlarda imprintlere daha az hücre dökülür. Örneğin, dizideki schwannoma (6 olgu, %6,2) ve kranio-faringiomların (3 olgu,%3,2) imprintleri hiposellülerdir. Schwannoma'da seyrek, iğsi, yuvarlak nükleuslu hücreler görülür ve fibroblastik meningiom ile schwannoma ayırımı güçtür. Schwannoma makroskopik daha sarı ve kistik, duraya geniş tutulumu vardır (10). Sitolojik çalışmalar, intraspinal schwannoma olgularında daha değerlidir. Meningiomda büklümlü nükleus görülmez (38). Meningiomların 1'i torakalde lokalizedir, imprintlerinde sinsiyal dizilimli meningotelial hücreler ve "whorl" yapısı izlendi, psammom cisimi görülmedi.

Yüksek dereceli astrositomların sitolojik tanısı, daha kolaydır. Belirgin nükleer pleomorfizm vardır, kimi olguda metastatik karsinomdan ayırımı güçtür. Fibriler zemin,

nöropili, sitoplazmik uzantılar, metastatik tümörden ayırımında yardımcıdır (37-39). Dizideki olguların 25'i yüksek dereceli astrositomdur, tümünde de izlenen fibriler zemin ve nöropili ayırıcı tanı için gereklidir. Glioblastom, meningiom ve anaplastik meningiomda intranükleer inklüzyonlar görülürse de (6), glioblastom ve meningiom olgularımızda görülmedi. Buna karşın, malign melanom metastazında, intranükleer pseudoinklüzyon vardı.

Düşük dereceli astrositomlarda, Rosenthal fibrilleri görülür ve anaplastik gliomdan ayırımında önemlidir. Yüksek mitotik indeks ve multinükleer dev hücreler de ayırıcı tanıda önemlidir (6). Düşük dereceli astrositomların 2'si pilositik astrositom olup oval, iğsi nükleuslu, ince uzun fibriler sitoplazmik uzantılı hücreler vardı, Rosenthal fibrilleri yoktu. Düşük dereceli astrositomların beyin dokusundan ve reaktif gliozisten ayırımı da güçtür.

Düşük dereceli astrositom ve oligodendrogliomda yuvarlak nükleus görülürse de oligodendrogliom hücreleri daha üniformdur. Fibriler astrositomda iğsi ve açılı yapan nükleus vardır. İyi diferansiye astrositomlar oligodendrogliomlar kadar sellüler değildir (6). Anaplastik oligodendrogliom, malign epitelial tümörden ayırt edilmelidir (37). Oligodendrogliom tanılı 4 olgumuzun 2'si anaplastiktir, imprintlerinde hafif pleomorfik yuvarlak nükleuslu hücreler görüldü, fibriler zemin, perinükleer halo epitelial tümörden ayırımında yardımcıdır.

Ependimomlar gençlerde görülür, sıklıkla derindedir ve küçük parçalı biyopsi alınabilir. Bu nedenle, intraoperatif sitolojik tanı önemlidir. Fibriler hücrelerin oluşturduğu pseudorozet yapısı görülür (40). İnce duvarlı damarsal çatı çevresinde çok sıralı ependimal hücrelerin dizilimi, "eğrelti otuna" benzetilir (41). Ependimomların epitelial ve astrositik diferansiye bipolar hücre özellikleri, sitolojide görülebilir, diffüz fibriler astrositom, pilositik astrositom ve metastatik karsinomdan ayırımı gerekir. Sitolojik özelliklerin benign olması, karsinomdan ayırımında önemlidir (42). Kendi olgularımızın biri sellüler ependimom, diğeri mikropapiller ependimomdur. Bunlarda üniform, yuvarlak nükleuslu, nükleer membranı düzenli, nükleolü belirli hücreler izlendi. Sellüler ependimomda hücre küme tabakaları vardı. Mikropapiller ependimomda, hücre kümesinin ortasında homojen metokromatik materyal vardı. Her iki olguda da, rozet yapısı görülmesi, tanıyı kolaylaştırır.

Psammom cisimleri, "whorl" yapısı, intranükleer pseudoinklüzyon görülmesi ile meningiom tanısı kolaylaşır. Astrositom ve ependimomların sitoplazmik uzantıları sinsiyal bir zemin oluşmasına neden olur ve yanlışlıkla

meningiom ile karışır. Meningotelial hücrelerin sito-plazmik uzantıları ise kısa ve kalındır (6). Dizideki 20 meningiomun 18'i tipik, biri atipik, biri de anaplastik meningiomdur.

Hipofiz adenomlarında imprint hızlı ve güvenilir tanı yöntemidir, ayrıca immun sitokimya yapılabilir. Bu yöntem, hücrenin içerdiği hormonun tanınmasını sağlar (12, 17). Neoplastik hücre kümeleri, nükleer pleomorfizm, kaba kromatin, düzensiz nükleolus, mitoz, bir hücre türü baskınlığı adenom için tanısaldır (12, 37). Frozen kesitte, donma artefaktına bağlı, nükleuslarda angulasyon oluşur ve yanlışlıkla metastatik karsinom düşünülebilir. Olgularımızın tümünün imprintleri tanısaldır. Smeardeki makrofajlar non-neoplastik olayı gösterirse de, önceden radyoterapi, kemoterapi alanlarda da makrofajlar görülebilir (6). Abse tanısı alan 2 olgumuzda çok sayıda makrofajlar izlendi.

MSS'in metastatik tümörlerinin başlıcaları bronkojenik karsinom, malign melanom ve meme karsinomudur. Metastatik adenokarsinomda sitoplazma daha bazofilik ve iyi sınırlıdır, sitoplazmik vakuoller ve belirgin nükleol bulunur. Metastatik amelanotik melanomun tanısı güçtür. Amelanotik melanom, büyük hücreli indifferansiye karsinom ve büyük hücreli lenfomadan ayırmak gerekir. Metastatik melanomun imprintlerine antikor paneli uygulanır (43). Dizideki olguların 14'ü imprint ve doku kesitlerinde metastatik karsinom tanısı aldı. Sitolojide papiller yapı ve epitelial dizilim izlendi. Malign melanomda nükleer pseudo inklüzyon ve melanin granülleri görüldü. Küçük hücreli karsinom ve indiferan karsinomun sitolojisi "malign tümör" düşündürdü, tür ayırımı yapılamadı.

Stereotaktik biopsi smearlerinde, hücreler nükleer pleomorfizm ve mitoz varlığına göre değerlendirilir. Bunlarda, proliferatif potansiyeli belirlenmek için, AgNOR yöntemi de uygulanır (25,26). AgNOR yöntemi astrositomları derecelendirmede, agresif meningiomların tanısında yardımcı olursa da, karşı çıkanlar da vardır (25). Smearlerde AgNOR, gliomları derecelendirmede, özellikle derece II-III olguların ayırımında, benign ve malign meningiomların ayırımında kullanılabilir (26,44). AgNOR çalışılan olgularımızın sayısı 28'dir. Astrositik tümörlerin 5'inde AgNOR değerleri saptanmış olup, glioblastomda 4.61-3.18 (2 olgu), anaplastik astrositomda 2.1-3.79 (2 olgu), derece II astrositomda 3.48 (1 olgu) bulunmuştur. Glioblastomda normalin çok üzerinde AgNOR değeri vardır. Glial tümörlerdeki AgNOR değerleri kontrol grupları ile karşı-

laştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmadı ($P>0.05$) Kaynaklarda, meningiomlarda AgNOR değerleri 3.091.09 ve 3.140.79 dir (24,26). Meningiom olgularının 7'sine AgNOR uygulandı (Tablo II). Anaplastik meningiomda AgNOR değeri 4.68'dir ve diğerlerinden yüksektir. Atipik meningiomda diğerleri ile aynı sayıda AgNOR değerleri saptandı. Sonuçta bu yöntemin, atipik ve anaplastik meningiomun ayırımında kullanılabilir diyebilmek için olgu sayısı azdır.

Hipofiz adenomlarında AgNOR sayısı hormon etkisine bağlı olarak yüksektir (26). Bayındır ve ark. hipofiz adenomlarında, imprintlerle histolojik preparatların AgNOR değerleri arsında fark olmadığını, buna karşın modifiye AgNOR boyama yönteminin intraoperatif tanıda adenom ve hipofiz dokusunu birbirinden ayırmada kullanmışlardır (45). Kendi dizimizdeki hipofiz adenomlarının 4'ünde AgNOR değeri saptandı. Bayındır ve ark. 106 primer intrakraniyal tümörde; AgNOR değerlerinde, parafin kesit ve imprintlerdeki ortalama değerler arasında anlamlı fark bulmadı, AgNOR değerleri ile DNA içeriği paraleldir (46). DNA'ya özgün boyalarla yapılan sitokimyasal çalışmalar, malign hücrelerde normallere göre daha yüksek düzeyde DNA bulunduğunu gösterdi (47). Beyin tümörleri DNA ploidi indeksi, malignitenin derecesi ile korelasyon gösterir (48). Canda, 194 astrositik tümör içeren çalışmada, histolojik kesitlerde, nükleer DNA içeriğinin astrositik tümörleri derecelendirmede ölçüt olabileceğini öngördü (27). Mikrospektrofotometri ile gallosyanin chromalum boyası yapılan olgularımızda DNA içeriği ölçüldü. Glial tümörlerde (19 olgu) ve metastatik tumorlerde (10 olgu) kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve DNA içeriğinde istatistiksel anlamlı ($P<0.01$) artış vardı. Ancak olgu sayısı az olduğundan, derece ile korele edilmedi. Hipofiz adenomu olgularının (5 olgu) DNA içeriğinde, kontrollere göre, istatistiksel olarak anlamlı yükselme bulunmadı.

Sonuç olarak, imprint yöntemi, beyin biyopsilerinin hızlı tanısında frozen ve parafin kesitleri derecelendirmede yardımcıdır. Imprint preparatlara immun sitokimya, gallosyanin chromalum ve AgNOR boyaları başarı ile yapılabilir. Özellikle biopsi çok küçük olduğunda, çok değerlidir. Buna karşın, schwannom, kraniofaringiom gibi sert dokularda, atipik meningiom, hemangioblastom, radyonekroz gibi lezyonların tanı ve ayırıcı tanısında imprint tek başına yetersizdir.

Kaynaklar

1. Sidaway MK, Silverberg SG. Intraoperative cytology: Back to the future? *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 1-3.
2. Cartwright DM, Howell LP. Intraoperative cytology as an elective surgical procedure. Analysis of 57 cases. *Acta Cytol* 1993; 37(3): 280-286
3. Owing RM. Rapid cytologic examination of surgical specimens: A valuable technique in the surgical pathology laboratory. *Hum Pathol* 1984; 15: 605-614
4. Kim K, Phillips ER, Paolino M. Intraoperative imprint cytology: Its significance as a diagnostic adjunct. *Diagn Cytopathol* 1990; 6: 304-307
5. Mair S, Lash RH, Suskin D, Mendelsohn G. Intraoperative surgical specimen evaluation: Frozen section analysis, cytologic examination, or both? A comparative study of 206 cases. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 8-14.
6. Folkerth RD. Smears and frozen sections in the intraoperative diagnosis of the central nervous system lesions. *Neurosurg Clinic of North Am* 1994; 5(1): 1-17.
7. Mennel HD, Rossberg C, Lorenz H, Schneider H, Hellwig D. Reability of simple cytological methods in brain tumour biopsy diagnosis. *Neurochirurgia* 1989; 32: 129-134.
8. Cahill EM, Hidvegi DF. Crush preparations of the central nervous system. A useful adjunct to the frozen section. *Acta Cytol* 1985; 29: 275-285.
9. Reyes MG, Homsy MF, McDonald LW, Glick RP. Imprint, smears and frozen sections of brain tumors. *Neurosurgery* 1991; 29(4): 578-579.
10. Torres LFB, Collaço LM. Smear technique for the intraoperative examination of nervous system lesions. *Acta Cytol* 1993; 37(1): 34-39.
11. Stefano DD, Scucchi LF, Cosentino L, Bosman C et al. Intraoperative diagnosis of nervous system lesions. *Acta Cytol* 1998; 42: 346-356.
12. Martinez AJ, Moosy J. Cytological diagnosis of pituitary adenomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1983; 42(8): 307.
13. Cappabianca P, Spazianle R, Caput F, Pettinalo G, et al. Accuracy of the analysis of multiple small fragments of glial tumors obtained by the stereotactic biopsy. *Acta Cytol* 1991; 35(5): 505-511.
14. Yachnis AT. Intraoperative consultation for nervous system lesions. *Semin in Diag Pathol* 2002; 19(4): 196-206
15. Dumas-Duport C, Scheithauer BW, Kelly PJ. A histologic and cytologic method for the spatial definitions of gliomas. *Mayo Clinic Proceeding* 1987; 62: 435-449.
16. Finkle HI. Protoplasmic astrocytoma: Cytologic features on tissue imprint preparation. *Diagn Cytopathol* 1992; 8(4): 430-431.
17. Hitchcock E, Morris CS, Sotelo MG, Salmon M. Comparison of smear and imprint techniques for rapid diagnosis in neurooncology. *Surg Neurol* 1986; 26: 176-182.
18. Collins VP. Monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein in the cytologic diagnosis of brain tumors. *Acta Cytol* 1984; 28: 401-405.
19. Ng HK, Lo STH. Immunohistochemical diagnosis of central nervous system. Tumors on smear preparations. *Eur Neurol* 1988; 28: 142-145.
20. Meehan SM, Magee H, Corney DN, Dervan PA. The diagnostic value of silver nucleolar organizer region. Assessment in breast cytology. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 689-693.
21. Hara A, Sakai N, Yamada H, Hirayama H, et al. Nucleolar organizer regions in vascular and neoplastic cells of human gliomas. *Neurosurgery* 1991; 29: 211-215.
22. Huang MS, Hwang JJ, Tsai MS, Wang TH, Lin MS, Chang IW, Isai SY. Application of staining of nucleolar organizer regions in cytological smears of the bronchus. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chin* 1992; 8(3): 136-140.
23. Cerdillo MR. AgNOR counts are useful in cervical smears. *Diagn Cytopathol* 1992; 8(3): 208-210.
24. Plate KH, Rüschoff, Behake J, Mennel HD. Proliferative potential of human brain tumours as assessed by nucleolar organizer regions (AgNOR) and Ki-67 immunoreactivity. *Acta Neurochirurgica* 1990; 104: 103-109.
25. Centeno BA, Louis DN, Kupsky WJ, Preffer FI, Sobal RA. The AgNOR technique, PCNA immunohistochemistry, and DNA ploidy in the evaluation of choroid plexus biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 690-696.
26. Plate KH, Arndt D, Hellwig D, Ruschoff J, Mennel HD. Assessment of histogenesis and proliferative potential in cytologic specimens of human brain tumors value of immunocytochemistry and nucleolar organizer regions. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1990; 12(3): 157-164.
27. Canda MŞ. Nuclear DNA content of astrocytoma and grading. *Aegean Medical Journal* 1983; 12: 59-74.
28. Reuck JD, Rode H, Eecheen HV. Cytophotometric DNA determination in human astroglial tumours. *Histopathology* 1979; 3: 107-115.
29. Salmon I, Dewitte O, Pasteels JL, Flament Durand J, Brotchi, Vereerstraeten P, Kiss R. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade and DNA histogram type. *J Neurosurg* 1994; 80: 877-883.
30. Base KK, Allison DC, Hruban RH, Pianta SA. A comparison of flowcytometry and absorption cytometric values as prognostic indicators for pancreatic carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 691-700.
31. Autondilov GG. Perspectives on the use of microspectrophotometry in the diagnosis of pre tumorous process and malignant tumors. *Cancer* 1976; 38(1): 254-258.
32. Bahr GF, Bartels PH, Dytch HE, Koss LG, Wied GL. Image analysis and applications to cytology. In: Koss LG (ed). *Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. Philadelphia: W.B. Lippincott Company. 1992; 1572-1612.

33. Shulte F, Wittekind D. Standardization of the Feulgen-Schiff technique. Staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation. *Histochemistry* 1989; 91: 321-331.
34. Coen H, Pauwels M, Roels F. The rat liver cell nuclear imprint as a for standart DNA mesuarements. *Anal Cell Pathol* 1992; 4(4): 273-285.
35. Ternier JY, Clark G. Gallocyanin -Chrome Alum: I. Tecniqe and specificity. *Stain Technol* 1960; 35(4): 167-177.
36. Claud RD, Weinstein RS, Howeedy A, Straus AK, et al. Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Mod Pathol* 1989; 2(5): 463-467.
37. Burger PC. Use of cytologic preperations in the frozen section diagnosis of central nervous system neoplasma. *The Am J Surg Pathol* 1985; 9(5): 344-354.
38. Gandolfi A, Tedeschi F, Brizzi R. The sqash smear technique in the diagnosis of spinal cord neurinomas. Report of three cases. *Acta Cytol* 1983; 27(3): 273-276.
39. Nguyen GH, Johnson ES; Mielke BW, Comparative cytomorphology of pituitary adenomas and oligodendrogliomas in intraoperative crush preperations. *Acta Cytol* 1992; 36(5): 661-667.
40. Ng HK. Cytologic features of ependymomas in smear preperations. *Acta Cytol* 1994; 38: 331-334
41. Rubinstein LJ (ed). *Tumors of the Central Nervous System (Atlas of Tumor Pathology)*. Washington: Armed Forces Institue of Pathology 1981; 134.
42. Loesel LS. Fine needle aspiration cytology of a cerebral ganglioglioma. Report of a case. *Acta Cytol* 1988; 32(3): 391-394.
43. Shoup SA, Johnson WW, Siegler HF, Tello JW, Schlom J; Bigner DD, Bigner SH. Panel of antibodies useful in the cytologic diagnosis of metastatic melanoma. *Acta Cytol* 1990, 34(3): 385-382.
44. Martin H, Hufnagl P, Beil M, Wenzelides K, Gott-Chalk J, Rahn W. Nucleolar organizer region associated proteins in cancer cells. Quantative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 1992; 14(4): 312-319.
45. Bayındır C, Doğan Ö, Ünal F, Dervişoğlu S. Nucleolar organizer region in pituitary gland adenomas. *Cytopathology* 1992; 3: 223-229.
46. Bayındır Ç, Öz B, Dervişoğlu S, Canda T, Çelik S, Primer intrakranial tümörlerde parafin kesit AgNOR değerleri ile sitolojik AgNOR ve DNA içeriğinin karşılaştırılması. IX. Ulusal Kanser Kongresi ve VI. Pediatrik Tümörler Kongresi Özet Kitabı. 1991; 281.
47. Borlegie B, Drewinko B, Schumann J, Göhde W, et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *The Am J of Med* 1980; 69: 195-203.
48. Vavruch L, Eneström S, Carstenson J, Nordenskjöld B, et al. DNA index and S-phase in primary brain tumors. A comparison between fresh and deparaffinized specimens studied by flow cytometry. *J Neurosurg* 1994; 80: 85-89.

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Nagihan ÇOLAKOĞLU
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Kınıklı Kampüsü 20070 DENİZLİ
Tel : 0 258 2134030/1393
Fax : 0 258 2132874
E-posta : ncolakoglu@pamukkale.edu.tr