



İki boyutlu AgNOR ölçümüne dayanan çalışmalarda yüz yerine elli hücre değerlendirilmesi arasında bir fark var mıdır?

Recep ERÖZ¹, Nurhan CÜCER², Yusuf AYDIN³, Semih YILMAZ⁴

¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

² Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

³ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bölümü, Düzce, Türkiye

⁴ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji ve Enzimoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Ribozomal gen bölgeleri olan çekirdekçi organize edici bölge (NOR), akrosentrik kromozomların ikincil boğumlarında yer alır ve aktif olduklarında gümüşle boyanırlar. Bu bölgeler ile ilgili 100 hücrenin değerlendirilmesine dayanan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı 100 hücre yerine 50 hücre değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların 100 hücre ölçüldüğünde elde edilen sonuçlardan bir farkının olup olmadığını belirlemektir. Bu çalışmaya tiroidinden ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) yapılmış olan 6 nodüler guatr'lı (yaş aralığı 24–76) ve 10 kistik nodüler guatr'lı (yaş aralığı 26–69) birey dahil edildi. Bu biyopsi materyalleri AgNOR ların değerlendirilebilmesi için spesifik bir protokole göre boyandı. Her bir birey için önce ilk 50 çekirdek, daha sonrada ilk 100 çekirdek değerlendirildi ve her bir hücrenin AgNOR sayısı (herbir kişide toplam AgNOR sayısı/incelenen çekirdek sayısı oranı) ve “Toplam AgNOR alanı/çekirdek alanı” (TNA / ÇA) oranı her bir grup için tespit edildi. İlk 50 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama AgNOR sayısı (2.256 ± 0.552) ile ilk 100 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama AgNOR sayısı (2.243 ± 0.535) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (p = 0.600). Yine ilk 50 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama “TNA / ÇA” oranının (5.802 ± 1.524) ilk 100 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama “TNA / ÇA” (5.799 ± 1.525) oranından istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (p = 0.940). AgNOR sayısına ve AgNOR alan oranı artışına dayanan çalışmalarda 100 çekirdek yerine, 50 çekirdeğin değerlendirilmesinin metodun spesifitesini ve sensitivitesini etkilemediği, aksine daha az zaman gerektirdiğinden avantaj sağladığı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

NOR,
AgNORs,
guatr,
tiroid

Is there any difference between evaluations of fifty cells instead of one hundred cells in studies based on two-dimensional AgNOR measurement?

ABSTRACT

The NOR, sites of the ribosomal genes, are located on the secondary constrictions of five pairs of acrocentric chromosomes and are stained by silver if they are active. Many studies have been conducted about those regions based on the evaluation of 100 cells. The aim of the study was to detect if there is any difference between the results obtained by evaluation of 50 cells instead of 100 cells. In the current study, six patients with nodular goitre (age range 24-76 years) and ten individuals with cystic nodular goitre (age range 26-69 years), fine needle aspiration biopsy (FNAB) was performed from whose thyroids, were included. Then the biopsy materials were stained for AgNOR evaluation using a specific protocol. At first 50, and then 100 nuclei per individual have been evaluated, and AgNOR count and “Total AgNOR area / Nuclear area” (TNA / NA) values of individual cells were detected for each group. There was no difference between mean AgNOR number obtained from evaluation of first 50 cells (2.256 ± 0.552) and 100 cells (2.243 ± 0.535) (p = 0.600). Moreover, mean “TNA / NA” obtained from evaluation of first 50 cells (5.802 ± 1.524) was not statistically different from the mean values of first 100 cells (5.799 ± 1.525) (p = 0.940). It was concluded that, in studies which based on AgNOR count and measurement, evaluation of 50 nuclei instead of 100 nuclei does not effect the sensitivity or specificity of the method, and does not alter the results of the study, conversely, it provide advantage because of less time requirement.

Keywords:

NOR,
AgNORs,
goitre,
thyroid

1. Giriş

Çekirdekçik organize edici bölgeler (NORlar), ribozomal ribonükleik asitleri (rRNA) transkribe eden ve insan akrosentrik kromozomlarının (13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar) kısa kollarında yerleşen, ribozomal deoksiribonükleik asit ilmekleridir (rDNA). Bu bölgelerin aktivitesi direk olarak protein sentezi ile ilişkilidir, bu nedenle aktif NOR'ların sayısı hücre aktivitesine göre artar [1-3]. Gümüşle boyanmış görünen NOR'lar ve NOR ile ilişkili arjirofilik proteinler sırasıyla, AgNORlar ve AgNORlarla ilişkili proteinler olarak adlandırılırlar [4]. Gümüş boyama tekniği ile transkripsiyonel olarak aktif NORlar ve ilgili arjirofilik proteinler görüntülenebilir [3, 4]. Bunun için AgNOR boyama yöntemi interfaz çekirdeğindeki çekirdekçiği [4] ve metafaz kromozomları üzerindeki aktif NOR bölgelerini göstermek için kullanılan en önemli metodlardan biridir [5]. İnterfaz çekirdeğinde bulunan AgNOR proteinlerinin miktarı ile çekirdekçik aktivitesi ve hücre proliferasyon hızı arasındaki ilişki oldukça yoğun araştırılmakta olup iyi bilinmektedir [3, 6]. Bu teknik, çeşitli hastalıkların, benin ve malin lezyonların tanımlanması, prognozun saptanması ve hücrenin bölünme aktivitesi hızının tespiti gibi araştırmalarda kullanılmaktadır [5, 7].

Bu çalışmayla, tiroid nodüllerinden İİAB yapılmış guatrlı olguların ilk 50 çekirdeğinin ve ilk 100 çekirdeğin AgNOR sayıları ve "TNA / ÇA" oranları arasında, bireye ait ortalama sayı ve oranları etkileyecek, bir fark olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık.

2. Materyal ve metod

Kistik nodüler guatr tanımlı 10 ve nodüler guatr tanımlı 6 olgu bu çalışmaya dahil edildi. Çalışma için yerel etik kuruldan izin alındı. Öncelikle bir endokrinoloji uzmanı tarafından bu hastaların tiroid nodüllerinden, ultrason

eşliğinde İİAB ile örnekler alındı. Her bir hastadan alınan aspirasyon mateyali temiz bir lama damlatılarak yayıldı ve oda sıcaklığında, yaklaşık olarak 15 dakika kurumaya bırakıldı. Havada kurutulan preparatlar absolute metanolde yaklaşık olarak 5 dakika fikse edildi. Daha sonra Benn ve Perle [8] ve Lindner [9] protokolünün hafif modifikasyonu ile AgNOR boyama işlemi yapıldı. Gümüş ile boyama işlemi sonrası, preparatlar bi-distile suda çalkalandı ve 2 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Her bir birey için başlangıçta ilk 50 çekirdek değerlendirilip, sonuçlar kaydedildi. Daha sonra değerlendirilen çekirdek sayısı 100'e tamamlandı. Değerlendirilen her bir hücredeki AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranları bir bilgisayar programı kullanılarak hesaplandı [10].

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. İstatistiksel analiz Paired-Samples T Testi kullanılarak yapıldı (SPSS yazılım, version: 11.0). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

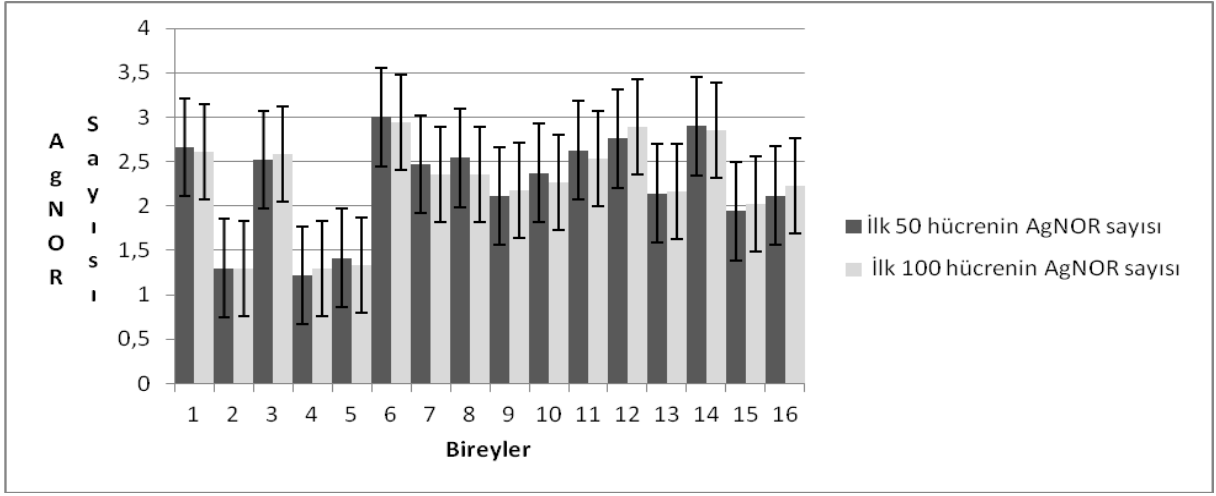
3. Bulgular

Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş ortalaması 50.437 ± 17.625 olarak hesaplandı. Bu çalışmada, ilk 50 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama AgNOR sayısı (2.256 ± 0.552) ile ilk 100 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama AgNOR sayısı (2.243 ± 0.535) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.600$) (Tablo 1) (Şekil 1). Buna ilaveten ilk 50 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama "TNA / ÇA" oranı (5.802 ± 1.524) ile ilk 100 çekirdek değerlendirildiğinde elde edilen ortalama "TNA / ÇA" oranı (5.799 ± 1.525) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($P = 0.940$) (Şekil 2). Gümüş ile boyanmış olan guatr (a) ve kistik nodüler guatrlı (b) hastalara ait olan NORlar'ın görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir.

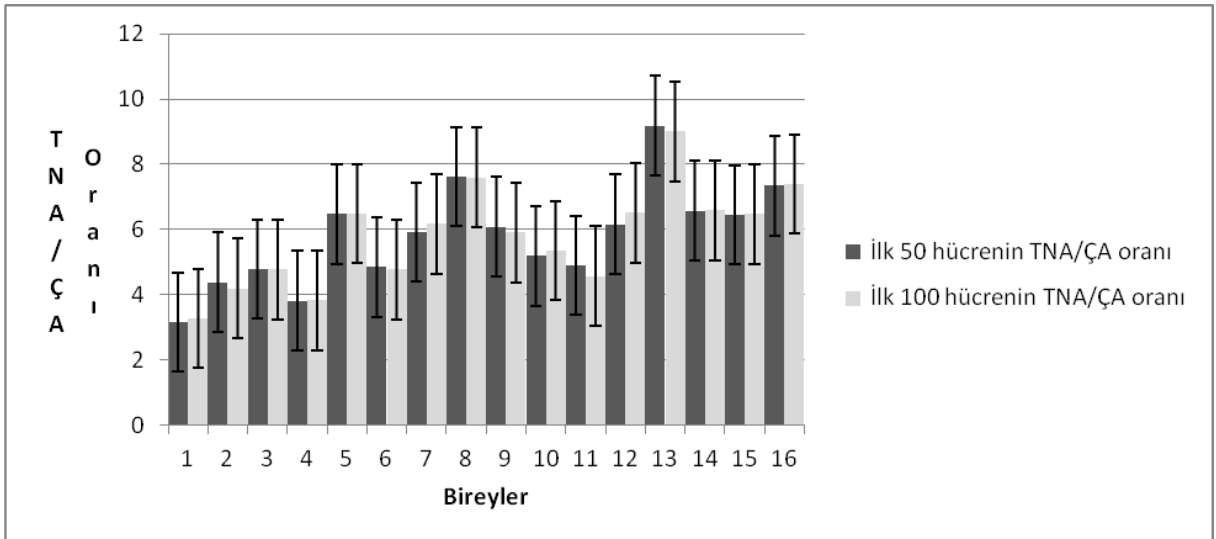
Tablo 1. Nodüler ve kistik nodüler guatrlı hastalarda ilk 50 ve ilk 100 çekirdeğin değerlendirilmesi sonucu elde edilen AgNOR sayısı ve "TNA / ÇA" oranları.

Grup	N	n	AgNOR sayısı/çekirdek Ortalama \pm SS	TNA / ÇA Ortalama \pm SS	P
İlk 50 hücre	16	800	2.256 ± 0.552	5.802 ± 1.524	0.600 ^a
İlk 100 hücre	16	1600	2.243 ± 0.535	5.799 ± 1.525	0.940 ^b

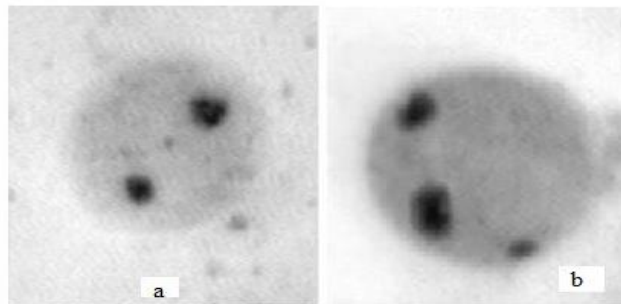
N: Birey sayısı n: İncelenen hücre sayısı SS: Standart sapma α : AgNOR sayısı için p değeri β : "TNA / ÇA" oranı için p değerini göstermektedir.



Şekil 1. Hastaların bireysel ilk 50 ve 100 hücredeki AgNOR sayısı/çekirdek oranı ortalamaları.



Şekil 2. Hastaların bireysel ilk 50 ve 100 hücredeki "TNA / ÇA" oranı ortalamaları.



Şekil 3. Değerlendirilen hücrelerin mikroskopik görüntü örnekleri: (a) guatr (b) kistik nodüler guatr hastası olan bireylere ait tiroisit hücresi.

4. Tartışma ve sonuç

AgNOR proteinleri uzun süredir bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olup bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. Hibrid hücreler kullanılarak yapılan bir çalışmada rRNA transkripsiyonu için AgNOR proteinlerinin gerekli olduğu gösterilmiştir [11]. Buna dayanarak, hücre siklusu süresince AgNOR proteinlerinin miktarındaki oluşan değişikliğin, çoğalan hücrelerde oluşan ribozom biyogenezinin uyarılması ile doğrudan bağlantılı olabileceği ileri sürülmektedir. AgNOR tekniğinin hücre çoğalması için bir indeks sağladığını, hücre içerisinde sayılan AgNOR lekelerinin sayı, şekil ve dağılımının yalnızca morfoloji hakkında değil, aynı zamanda hücrenin davranışı hakkında da bilgi verdiği bildirilmiştir [12].

İnterfaz çekirdeğinde gözlenen AgNOR proteinlerinin miktarlarındaki değişikliklerin tümör patolojisi ve farklı kanser türlerinin tanısal ve prognostik karakterizasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır [6, 13, 14]. AgNOR proteinleri hücre çoğalmasına ilaveten, hücre metabolizması ile de ilişkilidir [15]. AgNOR düzeylerinde görülen değişiklikler protein sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. AgNOR proteinlerinin sayı ve hacmindeki artışların hücre çoğalması, farklılaşma ve salgı aktiviteleri gibi hücre işlevlerindeki artış ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [14, 16, 17]. Bu nedenle bu yöntem kullanılarak 100 hücrenin değerlendirildiği çok sayıda çalışma yapılmıştır [13, 14, 18-23].

Bazı hastalarda, lenfositik tiroiditis ile ilişkili bir tiroid neoplazmasının sitolojik tanısı [24, 25] ve karakteristik olmayan papiller kısımlı yaymaların doğru yorumlanması zordur. Önceki çalışmamızda, aynı yöntemi kullanarak benin ve malin lezyonları ayırmak için cutoff değerleri tanımlanarak bu metodun malin ve benin tiroid lezyonlarında hücre proliferasyon aktivitesini değerlendirmek için güvenilir bir metod olduğu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceği gösterilmiştir [14].

Literatürde “Toplam AgNOR sayısı / Toplam Çekirdek sayısı”, “Toplam AgNOR alanı / Toplam Çekirdek sayısı”, çekirdekçik alanlarının ya da çaplarının ortalamaları kullanılarak yapılmış çeşitli çalışmalar vardır [13, 25-34]. Bu yöntem de “TNA / ÇA” oranının her bir hücre için ölçümü bireysel hücrelerin NOR proteinlerini sentezleme kapasitesindeki değişikliklerin tespit edilmesine yarar. Böylece her bir hücrenin proliferasyon hızı hakkında daha gerçekçi sonuçlar elde edilmiş olur. Bunun için malin ve benin tiroid lezyonlarını ayırmada bizim kullandığımız yöntemin başarı oranı daha yüksektir. Bu yöntemin, uygulamada basit ve ucuz olması da sağladığı diğer avantajlardandır [13, 14]. Fakat yapılan bu çalışmalarda 100 hücrenin değerlendirilmesiyle gereğinden fazla

zaman harcanıyor olması muhtemeldir. Bu nedenle, harcanan bu zamanın (incelenen hücre sayısını azaltarak) kısaltılmasının mümkün olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, aynı bireylerin ilk 50 hücresinin AgNOR değerleri (ortalama AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranı) ile ilk 100 hücresinin aynı değerleri arasında anlamlı bir farkın olup olmadığını tespit edilmeye çalışılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde aynı amaçla yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Elde edilen sonuçlar, aynı bireylerin ilk 50 hücresinin AgNOR değerleri ile ilk 100 hücresinin AgNOR değerleri arasında anlamlı bir farkın bulunmadığını göstermektedir.

Dolayısıyla, AgNOR değerlendirmesine dayanan çalışmalarda (ortalama AgNOR sayısı ve “TNA / ÇA” oranının tespiti için) 100 hücre yerine 50 hücrenin değerlendirilmesinin çalışma sonucunu değiştirmeyeceği ileri sürülebilir. Sonuçlara dayanarak, bundan sonra yapılacak çalışmalarda 100 hücre yerine 50 hücrenin değerlendirilmesi ile (hem preparatlardan değerlendirilmeye uygun hücrelerin seçilmesi, bunların resimlerinin bilgisayar ortamına aktarılması ve görüntü analizlerinin yapılması için) harcanan sürenin yarıya indirilmesinin mümkün olabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Rivero, E.R.C., Aguiar, M.C.F., Analise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenoide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR, J. Bras. Patol. Med. Lab., 38(1), 39-44, 2002.
2. Schliephake, H., Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review, Int. J. Oral Maxillofac Surg., 32, 233-245, 2003.
3. Bukhari, M.H., Niazi, S., Hashmi, I., et al., Use of AgNOR index in grading and differential diagnosis of astrocytic lesions of brain, Pak. J. Med. Sci., 23(2), 206-210, 2007.
4. Trere, D., AgNOR staining and quantification, Micron, 31, 127-131, 2000.
5. Imamoglu, N., Demirtas, H., Donmez-Altuntas, H., et al., NORs Expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium, Cytometry Part B-Clin Cytom, 66B, 36-39, 2005b.
6. Pich, A., Chiusa, L., Margaria, E., Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology, Micron 31, 133-4, 2000.
7. Paiva, R.L., Sant'ana Filho, M., Bohrer, P.L., et al., AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study, Anal. Quant. Cytol. Histol. 26, 175-180, 2004.

8. Benn, P.A., Perle, M., Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney D.E. Czepulkowski BH. (eds). Human Cytogenetics, Constitutional Analysis, actual approach, Vol 1. pp 91-118, Oxford Univ. Press, 1986.
9. Lindner, L.E., Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR), Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41, 439-445, 1993.
10. Demirtas, H., Imamoglu, N., Donmez, H., et al., Condensed chromatin surface and NOR surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients, Ann Genet-Paris, 44, 77-82, 2001.
11. Miller, O.J., Miller, D.A., Dev, V.G., et al., Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cells hybrids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4531, 1976.
12. Cardillo, M.R., AgNOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses, Acta Cytologica, 36, 147-51, 1992.
13. Cucer, N., Imamoglu, N., Tozak, H., et al., Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell, Micron, 38, 674-679, 2007.
14. Eroz, R., Cucer, N., Karaca, Z., et al., The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid, Endocr. Pathol., 22, 74-78, 2011.
15. Dayan, D., Vered, M., Sivor, S., et al., Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. Exp. Gerontol., 37, 841-50, 2002.
16. Hall, P., Crocker, J., Watts, A., et al., A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in non Hodgkin' s lymphoma, Histopathology, 12, 373-381, 1988.
17. Jan Mohamed, M., Armstrong, J., Crocker, J., et al., The relationship between number of interphase NOR and NOR bearing chromosomes in non Hodgkin' s lymphoma, J. Pathol., 158 (1), 3-7, 1989.
18. Imamoglu, N., Demirtas, H., Donmez-Altuntas, H., Higher NORs-expression in lymphocyte of trisomy 21 babies/children: in vivo evaluation, Micron, 36, 503-507, 2005a.
19. Eroz, R., Cucer, N., Unluhizarci, K., et al., Evaluation of AgNOR spot number in thyroid papillary carcinoma and normal cells nuclei. Journal of Health Sciences, 19(2), 102-107, 2010.
20. Eroz, R., Okur, M., Berik, O., Down sendromlu çocuklarda AgNOR sayısı ile gelişim arasında bir ilişki var mı? Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1(1), 8-11, 2011.
21. Eroz, R., Okur, M., Ozkan, A., et al., Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants? Genetic counseling, 23(2), 249-253, 2012.
22. Eroz, R., Unluhizarci, K., Cucer, N., et al., Kistik Nodüler Guatrılı Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması, Konuralp Tıp Dergisi, 4(2), 31-35, 2012.
23. Eroz, R., Tasdemir, S., Dogan, H., Is there any relationship between decreased AgNOR protein synthesis and human hair loosing? Biotechnic & Histochemistry, 87(8): 494-498, 2012.
24. Hamburger, J.I., Hamburger, S.W., Fine needle biopsy of thyroid nodules: avoiding the pitfalls. NY State J. Med., 86, 241-249, 1986.
25. Ravinsky, E., Safneck, J.R., Differentiation of Hashimoto's thyroiditis from thyroid neoplasms in fine needle aspirates, Acta Cytol., 32, 854-861, 1988.
26. Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., et al., Directed proteomic analysis of the human nucleolus, Curr. Biol., 12(1), 1-11, 2002.
27. Denton, T.E., Liem, S.L., Cheng, K.M., et al., The relationship between aging and ribosomal gene activity in humans as evidenced by silver staining, Mech. Ageing Dev., 15(1), 1-7, 1981.
28. Das, B.C., Rani, R., Mitra, A.B., et al., The number of silver-staining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development, Mech. Ageing Dev., 36(2), 117-123, 1986.
29. Buys, C.H., Osinga, J., Anders, G.J., Age-dependent variability of ribosomal RNA-gene activity in man as determined from frequencies of silver staining nucleolus organizing regions on metaphase chromosomes of lymphocytes and fibroblasts, Mech. Ageing Dev., 11(1), 55-75, 1979.
30. Pedrazzini, E., Mamaev, N., Slavutsky, I., Age related decrease of NOR activity in bone marrow metaphase chromosomes from healthy individuals, Mol. Pathol., 51(1), 39-42, 1998.
31. Thomas, S., Mukherjee, A.B., A longitudinal study of human age-related ribosomal RNA gene activity as detected by silver-stained NORs, Mech. Ageing Dev., 92(2-3), 101-109, 1996.

32. Camargo, R.S., Shirata, N.K., di Loreto, C., et al., Significance of AgNOR measurement in thyroid lesions, *Analysis and Quantitative Cytology and Histology*, 28, 188-192, 2006.
33. Slowinska-Klencka, D., Klencki, M., Popowicz, B., AgNOR quantification in the diagnosis of follicular pattern thyroid lesions, *Analysis and Quantitative Cytology and Histology*, 25, 347-352, 2003.
34. Slowinska-Klencka, D., Klencki, M., Popowicz, B., Multiparameter analysis of AgNOR in thyroid lesions: comparison with PCNA expression, *Histol Histopathol*, 19, 785-792, 2004.