

PROSTATİK LEZYONLARDA NUKLEOLAR ORGANİZER REGİONS (NORs) DEĞERİNİN YERİ VE PROSTAT ADENOKANSERİNDE TÜMÖR EVRE, GRADE VE PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN DANSİTESİ (PSAD) İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Kadir Türkölmez** • Murat Bozlu** • Sadettin Küpeli** • Handan Özdemir*

ÖZET

Tümör diferansiyasyonu ve proliferatif aktivitesi, tümörün biyolojik davranışının önemli göstergeleridir. Rutin histolojik değerlendirmelerle bu parametrelerin ölçümü yetersiz olmaktadır. Silver staining nucleolar organizer regions (AgNOR) tümörün diferansiyasyonunun ölçümünde yardımcı bir yöntemdir.

Ondokuz hiperplastik, 31 intraepitelial neoplastik (PIN) ve 30 malign prostatik lezyonu olan vakada AgNOR metodu çalışılmıştır. Her vaka için ortalama AgNOR değerleri hesaplanmıştır.

BPH'li vakalarla karşılaştırıldığında, PIN ve prostat kanserli (Prostat ca) gruplarda ortalama AgNOR değeri belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Prostat ca'lı grupta, ortalama AgNOR değerleri, tümör evresi, prostat spesifik antijen dansitesi (PSAD) ve Gleason skorları ile karşılaştırılmıştır. Ortalama AgNOR değerleri, Gleason skoru ile belirgin bir korelasyon göstermiştir ($p<0.001$). Evre ve PSAD ile AgNOR değerleri arasında ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar bize, AgNOR değerlerinin, tümör diferansiyasyonunda değerli bir gösterge olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: -Prostat -Hiperplazi -Prostatik İnterapitelial Neoplazi -Karsinoma -Prostat Spesifik Antijen Dansitesi -Nucleolar Organizer Regions.

SUMMARY

Nucleolar Organizer Regions (Nors) in Prostatic Lesions. Comparison With Tumor Grade, Stage and Prostatic Specific Antigen Density (Psad) in Prostate Adenocarcinoma

Tumor differentiation and proliferative activity are important predictors of biological behavior while routine histological evaluation is fairly adequate to assess differentiation, tumor proliferative activity is difficult to measure. Silver staining for nucleolar organizer regions (AgNORs) is reported to be helpful for assessing tumor differentiation.

Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) were studied in 19 hiperplastic, 31 intra-epithelial neoplastic and 30 malignant prostatic lesions. The mean AgNOR count per case was calculated.

Mean AgNOR count was significantly higher ($p<0.001$) in prostatic intra-epithelial neoplasia (PIN) and adenocarcinoma compared with prostatic hyperplasia.

AgNOR counts were also compared to tumor stage, prostate specific antigen density (PSAD) and Gleason's score. Agnor counts correlated significantly with tumor Gleason's score ($p<0.001$). Stage of the disease and PSAD have been examined as well but no statistically significant correlation among these two parameters and the AgNOR count was found.

We conclude that AgNOR count may be a marker of tumor differentiation.

Key Words: -Prostate -Hyperplasia -Prostatic Intraepithelial Neoplasia -Carcinoma -Prostate Specific Antigen Density -Nucleolar Organizer Regions.

Nükleolus, protein sentezinde ve hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Nucleolar organizer regions (NORs), DNA segmentleridir ve ribozomal RNA için kodlayıcı genler içerirler (1).

NORs akrosentrik kromozomların kısa kollarında yer almaktadır (2). Son zamanlarda gümüş bağlı nucleolar organizer region'un (AgNOR) pek çok tümör tipi için önemli bir tanısal değer taşıdığına dair çalışmalar yapılmıştır (3). Malign hücreler benign hücrelere oranla daha fazla argyrophil NORs (AgNOR) içermektedir (4,5). Literatürde AgNOR'un; deri (6), lymphoid (7), meme (8), jinekolojik (9), mesane (10), gastrointestinal (11), prostat (12,13,14), böbrek (15,16), testis (17) gibi organ tümörlerinde tanısal ve prognostik değeri araştırılmıştır.

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı

Bizim çalışmamızda prostata ait benign, pre-malign ve malign lezyonlarda ortalama AgNOR değerleri açısından fark olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca prostat adenokanserli olgularda evre, PSAD, Gleason skoru ile ortalama AgNOR değerleri arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Ocak 1994- Aralık 1995 tarihleri arasında prostatik lezyon tesbit edilip yatarak tedavi gören toplam 80 vakada ortalama AgNOR değerleri ölçülmüştür. Vakaların dağılımı 19 BPH, 31 PIN; (PIN1: 14, PIN2: 11 ve PIN3: 6 vaka) ve 30 prostat ca'lı olmak üzere gruplandırılmıştır.

Tüm vakalarda detaylı bir anamnez, fizik muayene, rutin kan biyokimyası, tam kan, tam idrar tetkikleri, idrar kültürü, DÜSG ve İVP, abdominal ve transrektal ultrasonografi, PSA tetkikleri yapılmıştır. Prostat ca düşünülen olgularda ayrıca BT ve tüm kemik sintigrafileri yapılmıştır. TRUS ile prostat ağırlığı hesaplanarak PSAD değerleri ölçülmüştür.

BPH grubu> Klinik, radyolojik ve laboratuvar incelemeler sonucu BPH ile uyumlu olan ve TUR-P sonrası hazırlanan preparatların histopatolojik incelemelerinde BPH tanısı konulan vakalardan oluşturulmuştur.

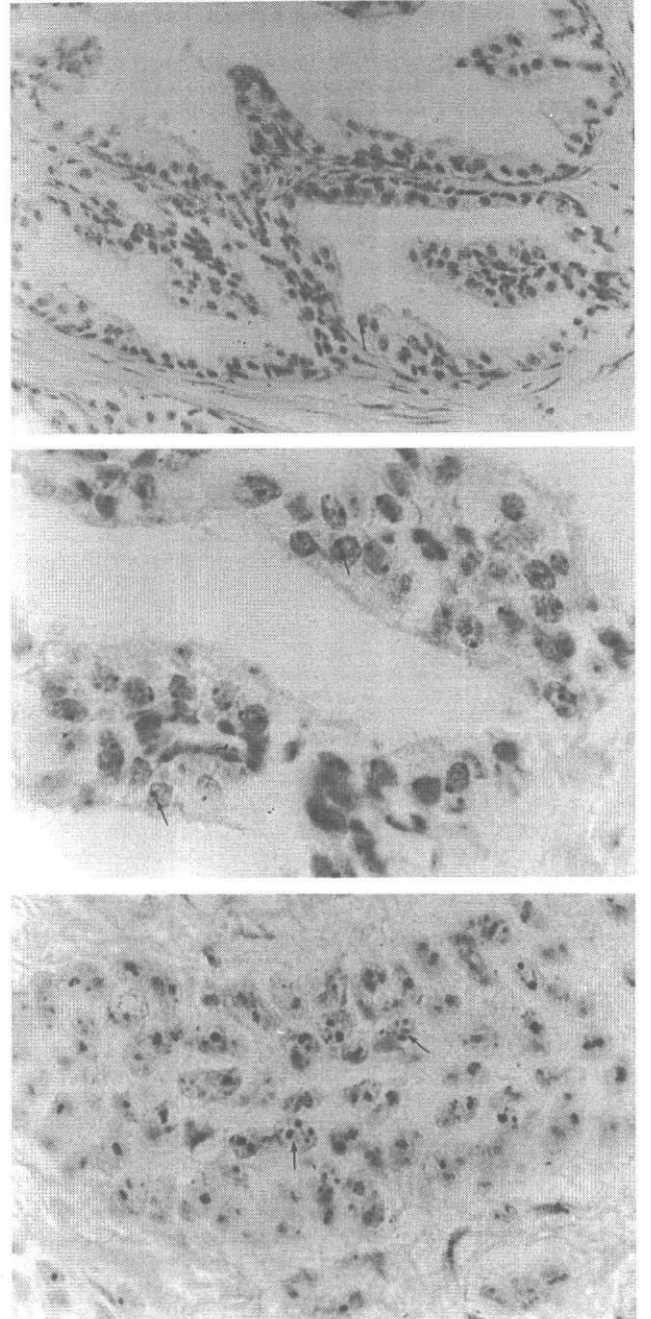
PIN grubu> BPH ön tanısıyla TUR-P uygulanan hastalarda ve ayrıca transrektal ultrasonografi eşliğinde sistematik 6 kadran prostat iğne biyopsileri alınıp yalnızca PIN tespit edilen vakalar bu gruba alınmıştır.

Prostat ca grubu> Yirmialtı vakada transrektal ultrasonografi (TRUS) eşliğinde sistematik altı kadran prostat iğne biyopsilerinin histopatolojik incelemelerinde ve prostat ca nedeniyle retropubik radikal prostatektomi uygulanan 4 vakada prostat spesimenlerinden histopatolojik olarak prostat ca tanısı konulan toplam 30 vaka bu gruba alınmıştır.

Prostat ca'da gradeleme sistemi olarak Gleason Grade'i kullanılmış olup her vaka için Gleason skorları belirlenmiştir (18).

Histopatolojik İnceleme: Tüm doku örnekleri % 10'luk formalin ile tesbit edilmiş, rutin takipten sonra parafin bloklara gömülmüş ve 5 mikron kalınlığında kesilmiştir. Rutin hematoksilin eozin ile boyama yapılmış ve prostat ca saptanan doku kesitleri eski tanıları bilinmeden retrospektif olarak Gleason sistemine (19) göre yeniden değerlendirilmiştir.

AgNOR Boyanma Yöntemi: % 10 Formalin ile tesbit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan elde edilen 4-5 mikron kalınlığındaki kesitler ksilol içinde



Şekil 1. (A) BPH'lı vakada her bir nükleus için düşük sayıda AgNOR boyanması izlenmektedir (X 100). (B) PIN 3 tespit edilen vakada her bir nükleus için BPH'ya göre daha çok sayıda AgNOR boyanması izlenmektedir (X 1000). (C) Prostat adenokanserli vakada ise yoğun bir AgNOR içeriği görülmektedir (X 1000). Gümüş boyasıyla boyanan NOR alanları oklarla gösterilmiştir.

3-5 dakikada deparafinize edildikten sonra usulüne uygun olarak rehidrate edilmiştir. Bir gram formik asit 100 ml distile su içinde çözüldükten sonra içine 2 gram jelatin eklenmiş ve çözünme sağlanarak AgNOR

solüsyonu hazırlanmıştır. Aynı bir kaptaki 50 ml distile su içinde 25 gr gümüş nitrat çözülerek % 50'lik gümüş nitrat solüsyonu elde edilmiştir. Karanlık oda ortamında AgNOR solüsyonundan bir hacim ve gümüş nitrat solüsyonundan iki hacim karıştırılarak hemen kullanılmıştır. Kesitler bu karışım ile tamamen kaplanarak 30 dakika 22- 27 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra karışım içinden çıkarılan kesitler deiyonize su ile yıkanarak ksilol ile rehidrate edilmiştir (20).

AgNOR Sayımı: Vakaların hepsinde random olarak seçilen 10 büyük büyütme alanında 100 tümör hücresinin nükleusu 15x100'lük büyütme altında sayılmıştır. Nükleus içinde gümüş nitratla boyanma gösteren ve birbirinden ayrı duran tüm noktalar sayılmıştır. Birbirinden ayırdedilemeyecek kadar yakın veya üstüste yapışık duran noktalar bir nokta olarak sayılmıştır. Ayrıca nükleol içinde de seçilebilen ve birbirinden ayrı duran noktalar da sayıma dahil edilmiştir. Figür 1(A)'da BPH, (B)'de PIN 3 ve (C)'de ise prostat ca'lı vakalarda AgNOR boyaması örnekleri görülmektedir. Bütün vakalarda her tümör hücresi içindeki sayılabilen maksimum yapı miktarı kaydedilmiş ve nükleus başına düşen ortalama AgNOR sayısı hesaplanmıştır (21). Kontrol olarak tümör içinde bulunan lenfoid doku veya çevrede izlenen normal mukoza sahaları alınmıştır. Bu alanlarda hücreler genellikle nükleus içinde 1 AgNOR içermektedir.

İstatistiksel Analiz; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik bölümünde yapılmıştır. Tek yönlü varyans analizi ve bağlı olarak DUNCAN testi ayrıca korelasyon analizi değerlendirme için kullanılmıştır.

BULGULAR

Ortalama AgNOR düzeyleri BPH grubunda 1.95 ± 0.43 , PIN1 grubunda 3.24 ± 0.46 , PIN2 grubunda 5.26 ± 1.18 , PIN3 grubunda 6.12 ± 0.82 ve prostat ca grubunda ise 9.40 ± 1.18 olarak bulunmuştur. Grup-

lar arasında ortalama AgNOR düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olduğu ve prostat ca'da diğer tüm gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 1).

Prostat spesifik antijen dansitesi (PSAD) oranlarının prostat ca'da diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek olduğu izlenmektedir. Bununla birlikte PSAD ile ortalama AgNOR değerleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Prostat ca grubunda bulunan 30 vakanın Gleason skorları 3-9 arasında değişmekte olup ortalama Gleason skoru 6.63 ± 1.69 olarak bulunmuştur. Gleason skoru ve ortalama AgNOR oranları arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu izlenmektedir ($r: 0.86$, $p < 0.001$) (Tablo 3a). Gleason skoru ve PSAD arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$) (tablo 3b).

Prostat ca grubunda TNM sistemine göre evreleme yapılarak ortalama AgNOR oranları ile evre arasındaki ilişki incelendiğinde; T1NoMo evrede 3, T2NoMo 5, T3NxMo 5 ve T2-4N1-2M1 17 vaka mevcut olup, ortalama AgNOR oranları sırayla 8.35 ± 1.63 , 9.45 ± 1.55 , 9.40 ± 0.92 ve 9.58 ± 1.08 olduğu izlenmektedir. Tümör evreleriyle ortalama AgNOR oranları arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Nükleolus, protein sentezinde ve proliferasyonun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Nükleolusların kontrolü esas olarak DNA'ya bağlıdır. Bu kontrol Nucleolar Organizer Regions (NORs) tarafından ribozomal RNA'ların yapımında kullanılan kodlayıcı genler yolu ile olmaktadır. NORs bölgeleri gümüş boyası ile boyanarak belirlenebilmektedir (AgNOR) (3).

Proliferatif aktivite ile AgNORs oranları arasında ilişki olduğu bilinmektedir (22). Prostatik lezyonlarda ortalama AgNOR oranları proliferatif aktivitenin belir-

Tablo 1. BPH, PIN ve prostat ca gruplarında ortalama AgNOR değerlerinin dağılımı (* $p < 0.001$) (n: Hasta sayısı).

	n	Ortalama AgNOR*
BPH	19	1.95 ± 0.43
PIN 1	14	3.24 ± 0.46
PIN 2	11	5.26 ± 1.18
PIN 3	6	6.12 ± 0.82
Prostat ca	30	9.40 ± 1.18
Toplam	80	

Tablo 2. BPH, PIN ve prostat ca gruplarında ortalama AgNOR değerleriyle prostat spesifik antijen dansitelerinin (PSAD) karşılaştırılması (n: Hasta sayısı)

	n	PSAD	r	p
BPH	19	0.06 ± 0.03	0.19	> 0.05
PIN 1	14	0.08 ± 0.07	0.34	> 0.05
PIN 2	11	0.09 ± 0.09	0.28	> 0.05
PIN 3	6	0.13 ± 0.06	0.24	> 0.05
Prostat ca	30	1.64 ± 0.7	0.28	> 0.05
Toplam	80			

Tablo 3. a) Prostat ca grubunda ortalama AgNOR değerleri ile Gleason skorlarının karşılaştırılması

Ortalama Gleason Skoru	:	6.63 ± 1.69
Ortalama AgNOR değerleri	:	9.40 ± 1.18
r	:	0.86
p	:	<0.001

Tablo 3. b) Gleason skoru ve prostat spesifik antijen dansitesi arasındaki ilişki

r	:	0,29
p	:	> 0.05

lenmesinde oldukça değerli bir yöntem olarak bulunmuştur (23).

Prostata ait benign lezyonlar ile (BPH) malign lezyonlar (prostat ca) ortalama AgNOR değerleri açısından karşılaştırılmış olup; Lloyd ve ark. BPH ve prostat ca'da ortalama AgNOR değerleri açısından anlamlı bir fark olmadığını bildirmiş olmalarına rağmen (24) daha sonra yapılan çalışmalarda BPH ve prostat ca arasında ortalama AgNOR değerleri açısından anlamlı farklılıklar bildirilmiştir (25,26).

Son zamanlarda prostat lezyonları açısından prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Hansen ve ark. PIN tespit edilen grupta ortalama AgNORs değerlerinin BPH'dan daha yüksek olduğunu bildirmiştir (27).

Çalışmamızda, BPH, PIN ve prostat ca grupları arasında AgNOR değerleri arasında anlamlı farklılık bulunup, PIN grubunda BPH'dan daha yüksek AgNOR değerleri olup, PIN grubu içinde ise; PIN derecesi arttıkça ortalama oranlarının da arttığı izlenmektedir. En yüksek değerler ise prostat ca grubunda izlenmektedir.

Prostat kanserli olgularda tümör prognozunda, tümörün proliferatif aktivitesi ve diferansiyasyon derecesi önemli parametrelerdir. Bunun belirlenmesi için klasik olarak histopatolojik olarak gradeleme sistemleri kullanılmaktadır. Prostat kanserli olgularda değişik gradeleme sistemleri kullanılmaktadır. MD Anderson sistemi ile gradeleme yapılarak ortalama AgNOR değerlerinin karşılaştırıldığı çalışmada grade arttıkça AgNOR değerlerinde yükseldiği bildirilmiştir (25,28).

Tablo 4. Prostat ca grubunda TNM klasifikasyonuna göre evre ile ortalama AgNOR değerlerinin karşılaştırılması (*p>0.05) (n: Hasta sayısı)

Evre	n	Ortalama AgNOR*
T1NoMo	3	8.35 ± 1.63
T2NoMo	5	9.45 ± 1.55
T3NxMo	5	9.40 ± 0.92
T2-4N1-2M1	17	9.58 ± 1.08
Toplam	30	

Gleason gradeleme sistemiyle ilgili olarak yapılan çalışmalar da mevcut olup Gleason grade ile ortalama AgNOR oranları arasında korelasyon tespit edilmiştir (23,24,29).

Bizim çalışmamızda Gleason gradelemesi yapılarak Gleason skoru kullanılmıştır ve yüksek Gleason skoru olan prostat kanserli olgularda ortalama AgNOR değerlerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Prostat kanseri grubunda evre ile AgNOR değerleri arasında ilişki olmadığı yönünde çalışma mevcuttur (28). Biz de evre ile ortalama AgNOR değerleri arasında anlamlı ilişki tespit edemedik.

Serum PSA düzeyleri, prostat ca'da tanı, evreleme ve takipte kullanılan çok değerli bir parametredir. Serum PSA düzeyi ile ortalama AgNOR oranları arasında ilişki olmadığı bildirilmiştir (29).

Son yıllarda PSA ile birlikte PSAD de sık kullanılan bir modifikasyondur. Biz, ilk kez PSAD ile ortalama AgNOR değerleri arasında ilişki olup olmadığı araştırdık ve PSA'da olduğu gibi PSAD ile AgNOR değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını gördük.

Eldi ettiğimiz bulgular ışığında, ortalama AgNOR değerleri prostata ait malign ve benign lezyonların ayırımında ve prostatik intraepitelyal neoplazinin (PIN) değerlendirilmesinde yardımcı bir parametre olarak görülmektedir. Ayrıca prostat kanserli olgularda tümörün diferansiyasyonun belirlenmesinde histopatolojik gradelemeye ilave olarak kullanılabilecek önemli bir gösterge olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular cell biology, New York, Scientific American Books 1986; 269-369.
2. Ferguson-Smith M.A, Handmaker SD. Observations on the satellited human chromosomes, Lancet 1961; 638-640.
3. Crocker J. Nucleolar organizer regions. In: Underwood JCE, ed. Pathology of Nucleus. London: Springer-Verlof, 1990; 158: 227-232.
4. Crocker J, Skilbeck N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: A quantitative study, J Clin Pathol 1987; 40: 885-889.
5. Egan MJ, Raafat F, Crocker J ve ark. Nucleolar organizer regions in small cell tumors of childhood, J Pathol 1987; 153: 275-280.
6. Homat AJ, Giri DD, Cotton DWIC ve ark. Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanomas, Cancer 1989; 63: 474-478.
7. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in Lymphomas, J Pathol 1987; 151: 111-118.
8. Smith R, Crocker J. Evaluation of the nucleolar organizer region-associated protein in breast malignancy, Histo-pathology 1988; 12: 113-125.
9. Ramsden AL, Murry P. Nucleolar organizer regions in cervical squamous pathology, J Clin Pathol 1989; 42: 781-782.
10. Ooms ECM, Veldhuizen RW. Argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions in bladder tumors, Virchows Arch (A) 1989; 414: 365-369.
11. Griffiths AP, Butler CW, Roberts P ve ark. Silver stained structures (AgNORs): Their dependence and tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma, J Pathol 1989; 159: 121-127.
12. Hansen AB, Ostergard B. Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue, Virchows Arch (A) 1990; 17: 9-13.
13. Deschenes J, Weidner N. Nucleolar organizer regions (NOR) in hyperplastic and neoplastic prostate disease, Am J Clin Pathol 1990; 14/12: 1148-1155.
14. Brawn PN, Ayala AG, Van Eschenbach A ve ark. Histologic grading study of prostate carcinoma, Cancer 1982; 49: 525-528.
15. Delahint B, Bethwaite PB, Nacey JN ve ark. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: Comparison with tumor grade, mitotic index and silver-staining nucleolar organizer regions numbers, J Pathol 1993; 170: 471-477.
16. Yang AH, Wang TU, Liu HC. Comparative study of the prognostic value of nucleolar grade and silver-binding nucleolar organizer region in renal cell carcinomas, J Pathol 1992; 166: 157-161.
17. Muller M, Lauke H, Hartmann M. The value of the AgNOR staining method in identifying carcinoma in situ testis, Path Res Pract 1994; 190: 429-435.
18. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer. A prospective, Hum Pathol 1992; 23: 273-279.
19. Gleason DF. Histological grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M ed. Urologic Pathology, The prostate. Philadelphia: Lea and Febiger, 1977; 171-197.
20. Ploton D, Menager M, Jeannesson P ve ark. Improvement in staining and in the visualisation of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at optical level, Histochem J 1986; 18: 5-14.
21. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardised approach, J Pathol 1989; 158: 185.
22. Leek RD, Alison MR, Samat CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues, J Pathol 1991; 165(1): 43-51.
23. Sakr WA, Sarkar FH, Srepathi ve ark. Measurement of cellular proliferation in human prostate by AgNOR, PCNA and SPF, Prostate 1993; 22(2): 147-154.
24. Lloyd SN, Johnson CP, Brown IL ve ark. Nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic disease, Histopathology 1991; 18(5): 449-452.
25. Pavlakis K, Alivizatos G, Mitropoulos D ve ark. Silver binding nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic lesions, Urol Int 1992; 49(3): 137-140.
26. Mamaeva S, Lundgren R, Eltvig P ve ark. AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate, Prostate 1991; 18(2): 155-62.
27. Hansen AB, Ostergard B. Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue, Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1990; 417(1): 9-13.
28. Alivizatos G, Pavlakis K, Giannopoulos ve ark. Nucleolar organizer regions in prostatic adenocarcinomas. Comparison with flow cytometric analysis, tumor grade, stage and serum prostate-specific antigen levels, Eur Urol 1992; 21(2): 141-145.
29. Deschenes J, Weidner N. Nucleolar organizer regions (NOR) in hyperplastic and neoplastic prostate disease, Am J Surg Pathol 1990; 14: 1148-1155.