

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**BARSAĞIN BENİGN ve MALİGN
TÜMÖRLERİNİN AGNOR YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ**

T622/1-1

**Uzmanlık Tezi
Dr. Tamer YEĞİNALTAŞ**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülten KARPUZOĞLU**

Antalya , 1993

622

T.C.
ARDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

BARSAĞIN BENİGN ve MALİGN
TÜMÖRLERİNİN AGNOR YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ

Uzmanlık Tezi
Dr. Tamer YEĞİNALTAY

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülten KARPUZOĞLU

"Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir"

Antalya , 1993

ARDENİZ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KÜTÜPHANESİ

İÇİNDEKİLER

| | |
|-----------------------------|---------|
| 1 - GİRİŞ | 1 - 33 |
| 2 - MATERYAL ve METOD | 34 - 35 |
| 3 - BULGULAR | 36 - 60 |
| 4 - TARTIŞMA | 61 - 82 |
| 5 - SONUÇ | 83 - 84 |
| 6 - ÖZET | 85 - 86 |
| 7 - KAYNAKLAR | 87 - 97 |

GİRİŞ

Nukleoluslar nukleus içinde yer alan zarsız ve RNA ile buna bağlı proteinlerden oluşmuş yapılardır. Genelde bazofilik boyanırlar, koyu boyanan kısımlara nukleolonema denir ve RNA yapısındadır. Açık renk kısımlarda ise nukleoplazma ve kromatin (DNA) vardır. Bu kromatinin görevi rRNA üretimidir (5, 39, 52, 59).

Mitozda kaybolan ve mitozdan sonra tekrar oluşacak nukleolusu kuracak, organize edecek şekilde görev alan ve yapılanan kromatin kısmına bir başka deyişle rRNA genlerine sahip DNA sarmallarına Mc Clintock 1934'de nukleolus organizatörü bölgesi (NOR) demiştir (5, 39, 52, 59).

NOR'ların yapısında bulunan nukleoproteinlerin gümüşe gösterdikleri afiniteleri nedeni ile de AgNOR proteinleri veya kısaca AgNOR denilmektedir (1, 3, 11, 33, 78, 89).

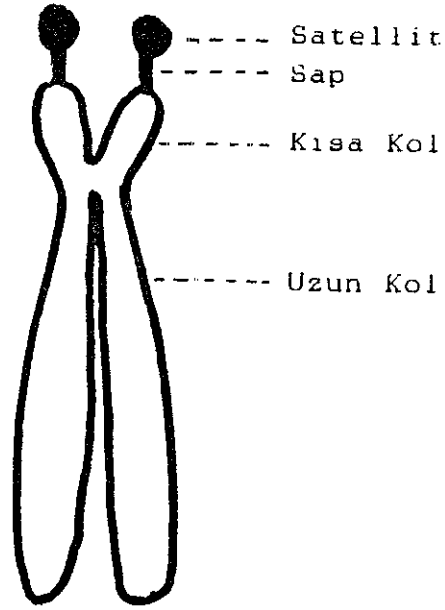
AgNOR yöntemi ise rRNA sentezine kaynaklık eden rDNA segmentlerinde yer alan proteinlerin nonhiston yapısındaki bazı nukleolar asidik fosfoproteinlerin gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopunda incelenmesini sağlayan bir tür gümüş boyası yöntemidir (1, 3, 11, 33, 42, 71, 78).

NOR'lar 18S ve 28S ribozomal RNA'nın üretimi için gerekli gen kodlarını bulundurlar ve RNA sentezine kaynaklık ederler (63).

NOR'larla birleşen nukleolus bölgelerine sıklıkla fibriler komponent denilir. Elektron mikroskopunda NOR'lar nukleolusta fibriler senterde iyi sınırlı daha elektron yoğun bölgeler içinde soluk boyanan alanlar şeklinde izlenir (2, 5, 30, 44, 52, 59).

İnsan akrosentrik kromozomları (bunlar D ve G grubu yani 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlardır.) rRNA genlerine sahiptirler (4, 5, 39, 52, 59). rRNA genleri satellit

olarak isimlendirilen kromozomların kısa kollarındaki telomerik bölgelerde kümeler halinde yerleşirler (57). (Şekil 1)



Şekil 1: Akrosentrik bir kromozomun şematik görünümü.

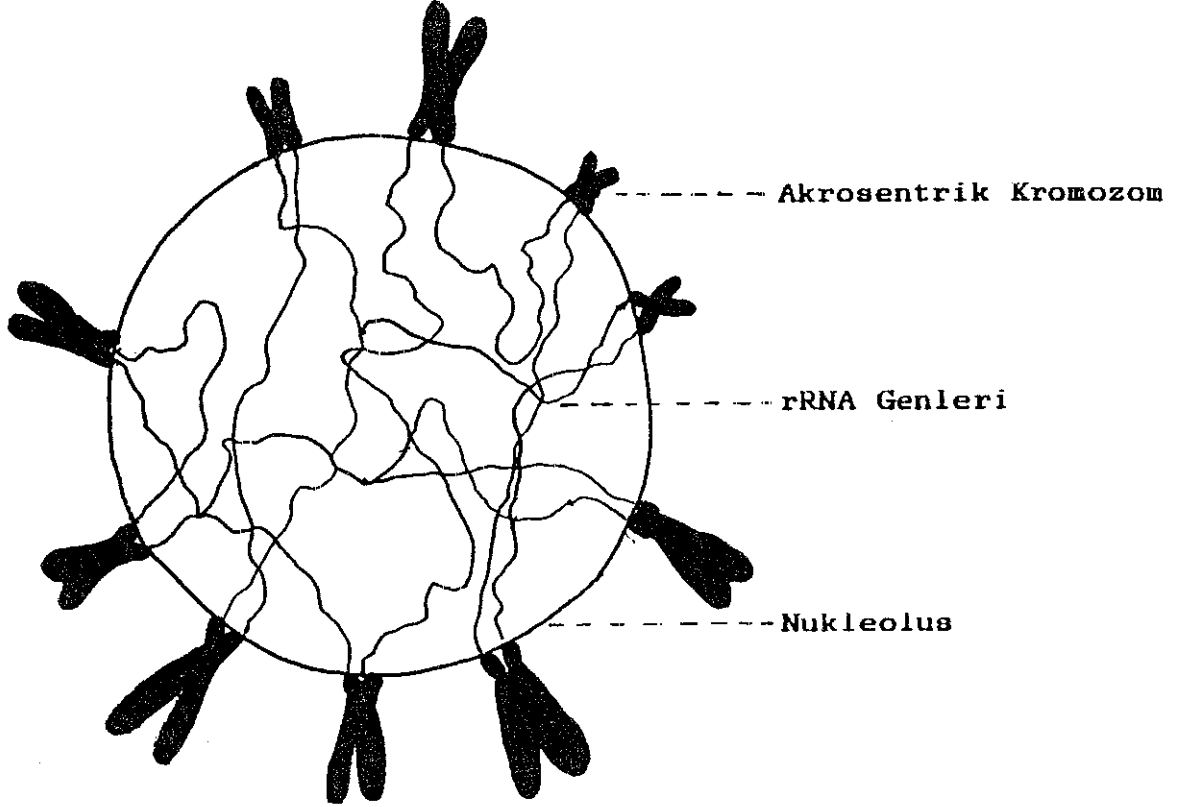
Genomun bu bölümünün interfaz süresince nukleosla birleştiği in situ DNA/RNA hibridizasyon yöntemi ile bilinmektedir (51, 57). (Şekil 2)

NOR'ları daha iyi anlayabilmemiz için hücre siklusunu da incelememiz gerekir ;

Hücre yaşamında interfaz ve mitoz evreleri vardır. İnterfaz bölünme halinde olmayan nukleusu gösterir. RNA sentezi interfaz boyunca olmaktadır. Mitozda ise nukleoluslar ayrıldığı ve parçalandığı için protein sentezi yoktur (5, 39, 52, 59).

İnterfaz bölümleri :

S fazı ; DNA'nın sentez fazıdır. DNA replikasyonu vardır. 6-8 saat sürer , bir hücre devrinin (doubling time) % 30-40'ını kapsar.



Şekil 2: Akrosentrik kromozomlarla nükleolus ilişkisini gösteren şematik görünüm.

G_2 ; S fazını takip eder. DNA sentezi yoktur fakat hücre bölünmesi için hazırlıklar vardır , hücre devrinin % 10-20'sini kapsar. G_2 'yi mitoz takip eder.

G_1 ; mitozdan sonra gelen dönemdir. Gelişen, yeni oluşan hücreler için hem stoplazma, hem de nükleolusun ihtiyacı olan aktif RNA sentezi yapılmaktadır. G_1 hücre devrinin % 30-40'ını kapsar. Bu dönemde nükleolus organizasyonu tam oluşmamış olabilir. Bu tip büyüme seyrek olarak interfazda kalır ve sonra bir veya daha fazla bölünme dönemine giderler. Bölünme açısından zayıf olan bu döneme bazıları G_0 (dinlenme dönemi) adını kullanmaktadır(39,52, 59).

Mitoz devreleri ise sırasıyla profaz, metafaz, anafaz ve telofaz şeklindedir. Metafazda akrosentrik kromozomlar

sıklıkla birbirine yakın yerleşim gösterirler. Bu olaya akrosentrik birleşme ismi verilmiştir (5, 39, 52, 59).

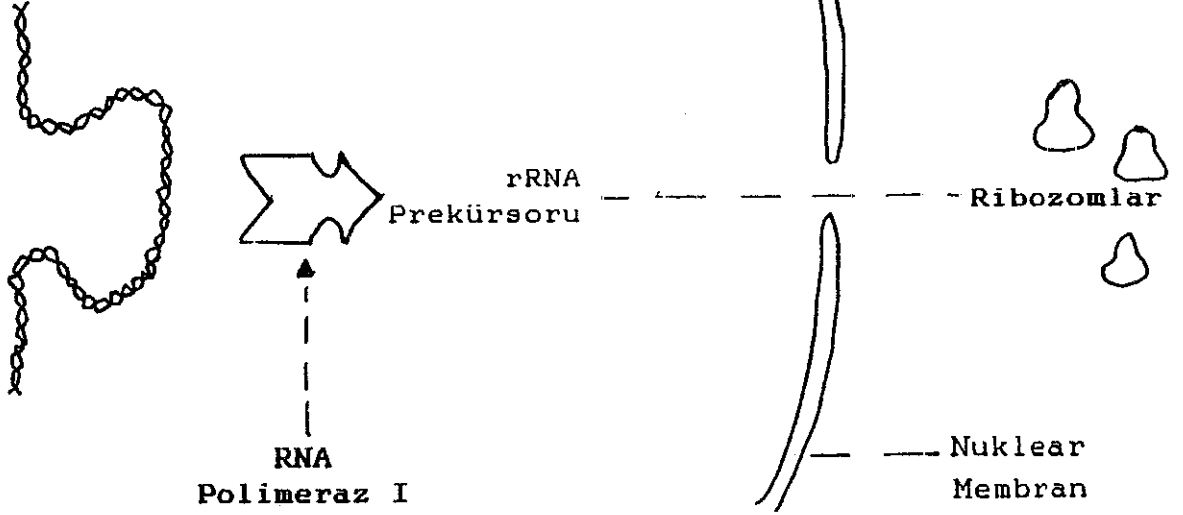
Satellit akrosentriklerin sayı ve boyut farklılıkları, akrosentrik birleşme oranı değişiklikleri normal bireylerdeki mitozlarda da olabileceği daha önceleride bildirilmiştir (35, 57).

İlerleyen bölümlerde daha ayrıntılı olarak incelenecek olan NOR'ların standart oluşumlar olmadığı bazen ailesel olarak, bazen selüler ve organizmadaki değişikliklere bağlı olarak değişebildikleri ileri sürülmüştür (24, 35, 57, 63). Ayrıca aynı bireydeki NOR farklılıkları NOR aktivitesindeki değişikliklere yorumlanmıştır (51).

Bugün daha çok NOR'ların hücrenin metabolik ve proliferatif aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hücrenin protein yapımına gereksinimi varsa yani hücre aktivitesi artmışsa DNA'daki rRNA genomları RNA polimeraz I ile aktive olurlar. Buraya kadarki aşama nükleus içinde meydana gelir ve oluşan emir ile de stoplazmadaki ribozomlar harekete geçerek protein sentezini başlatırlar. Böylece NOR'ların yapısı ve sayıları genellikle hücrenin metabolik aktivitesini ve proliferatif aktivitesini yansıtır, görüşü ağır basmaktadır(1,3,18,19, 21, 30, 33, 43, 49, 51, 84, 92). (Şekil 3).

Nükleusta NOR'ların yanısıra bunlarla birleşen histon ve nonhiston proteinlerde bulunmaktadır. Bu proteinlerin yapıları tam olarak bilinmemekle birlikte içlerinde RNA polimeraz I (63), C₂₃ proteini, B₂₃ proteini (1) ve C₂₃'e bağlı protein (82) olduğu ileri sürülmüştür. Bunların molekül ağırlıkları RNA polimeraz I'in 190K, C₂₃'ün 110K, B₂₃'ün 78K, C₂₃'e bağlı proteinin 100K olduğu saptanmıştır (1,63).

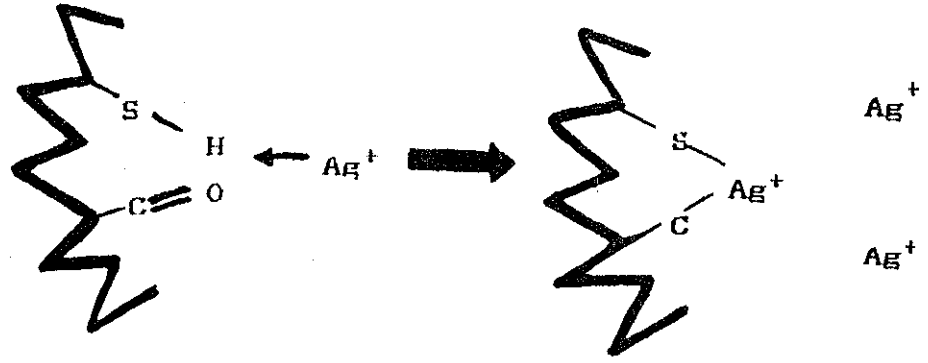
Nukleolar Organizer
DNA Sarmalı



Şekil 3:Basitleştirilmiş nükleolar organizer sarmalların RNA polimeraz I ile ilişkisi ve ribozom üretiminin gösterildiği şematik görünüm

AgNOR boyası bir tür gümüş boyası olup, NOR'lardan çok NOR'larla birleşen nonhiston proteinlere spesifiktir (1, 3, 33, 78, 92). Bu reaksiyon nonhiston proteinlerin sülfidril gruplarıyla gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonun olabilirliği ortamdan histon proteinlerin uzaklaştırılmasıyla bile devam ettiği şeklinde gösterilmiştir (11). (Şekil 4)

Nonhiston proteinlerin karboksil gruplarının gümüş solüsyonundaki, gümüşün mikro düzeyde şekillenmesini azalttığı düşünülmektedir. Bu nedenle bunlar disülfid ve sülfidril gruplarıyla (sistein ve sistinin) daha büyük gümüş çöküntüleri olarak yapılanmaktadır. Bu daha büyük toplantılar, birikintiler ise ışık mikroskopuyla oldukça kolay görülebilmektedir (11). İçerdikleri bu karboksil, sülfidril ve disülfid grupları nedeniyle farklı fiksatiflerde farklı sonuçlar vermektedir (29, 45, 92).



Şekil 4: NOR'larla birleşen proteinlerin gümüş bağlayan karboksil gruplarının nükleasyonu takiben etrafındaki sülfidril gruplarını gösteren şematik görünüm.

NOR'ların herbirinin yaklaşık 40 transkripsiyon ünitesine sahip olduğu bildirilmiştir (21).

NOR'lar bireyden bireye biraz değişmesinden başka yenidoğanda ve infant lenfositlerinde adultlardan daha çok sayıda AgNOR bulunduğu bildirilmiştir (24). Ayrıca fitohemaglutininle stimule edilmiş lenfositlerle, hızlı büyüyen fibroblastlar normal stimule edilmemiş hücrelerden daha fazla AgNOR'a sahiptirler (24, 57).

NOR'ların protein sentezi görevinin dışında hücre büyümesi, hücre differansiasyonu ve belki de malign transformasyonla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (50, 80, 89).

NOR değişiklikleri hastalıkla birlikteyse bu hastalık genellikle ya Down Sendromu veya malign hastalıktır. 21.kromozomdaki double NOR veya genişlemiş satellitler Down insidansını arttırır (4, 57, 89). Malign hastalıklarda NOR'ların sayıları ve boyutları değişir, artar (18, 50). Değişik malign dokulardaki hücreler genellikle normal

hücreden daha fazla nukleolus veya nukleoplazmayla birleşen daha fazla gümüş boyanan cisimcikler bulundurur(18, 36, 57). Bu nedenle normal ve malign dokulardaki gümüş boyanma farklılıkları daha önemli bir patolojik marker haline gelmiştir.

AgNOR 1970'li yıllardan buyana sitogenetikçilerce bir kromozom bantlama tekniği olarak metafaz kromozom yaymalarında ve özellikle trizomilerde kullanılmaktaydı (1, 4, 57). Ancak o zamanlar yapılan işlemler hem daha uzun süreyi kapsamakta, hem işlem basamakları fazla, hemde boyama aşamasında uygulanan ısı fazlaydı (1, 4).

1975'lerde öncelikle Goodpasture ve arkadaşları sonra Howell ve arkadaşlarının katkıları, ardından 1986'dan sonra Crocker ve Ploton'un boya yöntemini modifiye etmeleriyle bugünkü tek basamaklı kolay uygulanabilir aşamaya gelmiştir. Bugün uygulanan oda sıcaklığı zemin boyanmasını azaltmakta ve daha ince detaylarında görülebilir hale gelmesini sağlamıştır (1, 2, 21).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma AgNOR yönteminin diagnostik ve prognostik açıdan tümoral lezyonların değerlendirilmesinde oldukça yararlı bir proliferasyon indeksi olabileceğini ortaya koymaktadır (1, 3, 18, 19, 21, 30, 33, 43, 49, 51, 84, 92). Bu aşamada bugüne kadar kullanılagelmiş diğer hücre proliferasyon kriterleri ve yöntemlerinin kısaca gözden geçirilmesinde fayda vardır.

Diğer hücre proliferasyon metodları (84) ;

- Mitoz sayısı : özellikle yumuşak doku tümörlerinde önemlidir.
- İnvitro timidin labelling : S fazındaki (DNA sentez fazı) hücrelerin sayısını içeren bir metoddur . 2000 hücre sayılır ve timidin labelling indeks (ILI)

olarak sonuç verilir. Özellikle meme karsinomlarında kullanılır. TLI'sı yüksek olan olgularda erken rekürrens ve ölüm görülür. Genelde TLI ile flow sitometri arasında iyi bir ilişki izlenmektedir. Ancak DNA flow sitometrinin daha başka birçok avantajları olduğu için bu yönteme tercih edilmektedir.

- Mikrospektrofotometrik analiz : 560 µm dalga boyunda kullanılan mikrospektrofotometreye DNA'ya spesifik Feulgen reaksiyonuyla boyanmış parafine gömülü dokulardaki DNA içeriklerini ölçerek sonuç verir. Bugün için yerini flow sitometriye bırakmıştır.

- İmmünohistokimyasal teknikler :

* Bromohegzoüridin : Monoklonal bir antibodydir, haloprimidindir. Timidin analogu olup, S fazındaki (DNA sentez fazı) hücrelerin oranını verir. Buna bromohegzoüridin labelling indeks denir (76).

* Ki67 : Monoklonal bir antibodydir. G₀ (dinlenme fazı) dışındaki prolifere olan hücreleri gösterir. Taze dokuda, frozenla çalışılabilir, geriye dönük çalışmalarda kullanılamaz. AgNOR'la birlikte uygulanan olgularda çok iyi bir korelasyonu gösteren sonuçlar vermektedir (38, 46, 53, 56, 80, 82).

* Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, cyclin): Maksimal G₁ ve S fazındaki prolifere hücrelerde saptanır.

* DNA polimeraz alfa : Monoklonal antibodydir, taze dokuda çalışılabilir.

- Flow sitometri: Taze dokudan veya parafine gömülmüş dokuların hücre süspansiyonlarında çalışılır. Oldukça pahalı bir yöntem olup, alete gereksinim vardır.

S fazındaki (DNA sentez fazı) hücrelerin oranını, ploidi içeriklerini verir. AgNOR'la karşılaştırmalı çalışmalarda hem destekleyen hem de desteklemeyen bulgular saptanmıştır (19, 43, 71, 81, 95).

Bugün için tümör patolojisi ve hücre kinetiği alanında uygulama şansı bulmaya başlayan AgNOR yönteminin hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden hangilerinin ne ölçüde ve nasıl yansıttığı tam olarak anlaşılamamıştır. Halen uygulama farklılıkları, sayma karmaşası ve sonuçlar üzerinde yoğun tartışmalar vardır. AgNOR'un farklılıklarını açıklamak amacıyla şu görüşler ileri sürülmektedir (35) ;

- 1) Gen artımı (Amplifikasyonu): rDNA bölgelerini içeren DNA segmentlerinde artım vardır.
- 2) rDNA'nın transkriptif aktivitesinde değişiklik : Protein ihtiyacını karşılamak üzere aktif rDNA sayısında artış sözkonusudur. Bazıları inaktif rDNA'dan bahsetmekte ve bunların ancak hücre differansiasyonu süresince bir kısmının aktive olabileceğini veya tam tersine aktive olanların inaktif olabileceğini savunmaktadır.
- 3) Nukleolar ayrışma ve/veya nukleolar birleşme bozukluğu : Hücrede proliferatif aktivite yüksektir. Buna bağlı olarak rDNA'lar ve nukleoluslar büyük ölçüde ve sürekli olarak ayrılmış halde bulunurlar veya hücre siklusundan bağımsız olarak rDNA ve nukleoluslarda genel bir birleşme bozukluğu vardır.
- 4) Hiperploidi : rDNA segmentlerini içeren kromozomlarda sayıca artış sözkonusudur.
- 5) Hücrenel farklılaşma derecesi, AgNOR'u etkileyen faktörler olarak düşünülmektedir.

Bu grupları sırasıyla inceleyecek olursak ;

1) Gen artımı (amplifikasyonu) : Malign dönüşümde somatik mutasyonlar olabilir. Bazı sarkom ve karsinom türlerinde bazı lösemi ve lenfomalarda, testis tümörlerinde NOR yer değiştirmeleri (translokasyonları) ve ektopik NOR lokalizasyonları belirlenmiştir. Ancak bazı araştırmacılar bu tip değişiklikleri saptayamadıklarını bildirmişlerdir (26, 50, 89, 90).

Buradan yola çıkarak değişiklikten sonra daha agresif fenotipe sahip hücre klonları daha indifferan, daha agresif ve hızlı büyüyen tümör olacaktır (47). Sıçan hepatoma hücrelerinde, sıçan sarkom hücrelerinde, eritrolösemilerde çoğalma uğramış rDNA segmentleri taşıyan ve homojen boyanmış (homogeneously staining region - HSR) adı verilen yapılar ile karakterize özel kromozomlar saptanmıştır. Bu kromozomlara sahip (HSR içeren) hücrelerin diğerlerinden daha agresif oldukları görülmüştür (47).

2) rDNA'nın transkriptif aktivitesinde değişiklik : AgNOR sayı ve boyanma yoğunluğunun aktif transkripsiyon yapan rDNA'ların sayısına bağlı olarak değiştiği öne sürülmektedir. Bunlara göre rRNA aktif olmasıyla gümüş boyanmaktadır. Hücreler arasında rDNA aktivite düzeyinde farklılıklar olabilir (1, 35, 43, 86).

Bu görüşü ortaya çıkaran çalışmalara örnek insan fare hücre hibridlerinde AgNOR boyanması ile rRNA sentezi arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir (67).

Blastik transformasyon gösteren lenfositlerde gözlenen AgNOR artışı, rDNA aktivasyonuna bağlanmıştır (11). Fibroblast kültürlerinde rRNA sentezini uyaran büyüme hormonu ve dekzametazonun ortama atılması ile AgNOR sayısı artışı görülmüştür (11).

Farklı rDNA sentez hızlarına sahip insan hücre kültürlerinde rDNA aktivitesi ile AgNOR boyanması arasında doğrusal ilişki gözlenmiştir (35).

İnsan diploid fibroblast hücre kültürlerinde yapılan çalışmada AgNOR boyanması ile rRNA sentezinde kullanılan timidin (H^3) ile işaretli üridin miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (11).

Yaş arttıkça, lenfosit metafazlarında rDNA'ların giderek inaktif hale gelmesi ve kaybı ile birlikte AgNOR sayısında azalma izlenmiştir (24).

Bütün bu çalışmalarda gerçek tümöral olaylar incelenmemiş, yapım faaliyeti artmış normal ve hiperplazik hücreler değerlendirilmiştir. Bunlara karşın Derenzini ve arkadaşları çoğalma hızı, interfazik AgNOR sayıları farklı iki ayrı nöroblastom hücre kültüründe rRNA düzeyleri arasında bir fark gözlememiştir (28).

rRNA'nın sentezini bloke eden aktinomisin D, D-Galaktozamid, adriamisin gibi maddelerle bile rRNA sentezi bloke edilse de AgNOR artışı tam olarak ortadan kalkmamaktadır. rRNA sentezinin doğal olarak durduğu metafazda bile kromozomlar üzerinde AgNOR boyanması gözlenmektedir. rRNA sentezinin olmadığı bilinen olgun oosit ve tek hücreli embriyoda elektron mikroskopik olarak AgNOR boyanması izlenmiştir. Adriamisin ile tedavi edilen tükrük bezi adenomunda AgNOR artışı kontrol altına alınamamıştır(35).

3) Nukleolar ayrışma, nukleolar birleşme bozukluğu : Nukleolus organizasyonu hücrenin bulunduğu siklus fazına bağlı olarak değişmektedir. rDNA'ları taşıyan kromozomların hareketlerine bağlı olarak profaz ile birlikte nukleolusta ayrışma, parçalanma başlar ve tüm mitoz boyunca kromozomal

dağılma devam eder, rRNA sentezi durur. Bu nedenle nukleolus organizasyonu görülmez (nukleolar ayrışma). Geç telofaz ve erken G_1 dönemlerinde rDNA segmentleri ve yeniden ortaya çıkan AgNOR segmentleri birleşir. Bunu takiben rRNA sentezi yeniden başlar. Prenukleolar cisimcikler ve nukleoluslar oluşur (nukleolar birleşme) (5, 39, 52,59).

Hızla çoğalan, yüksek grade'li tümörlerde nukleolar birleşmenin henüz tamamlanmadığı erken G_1 ve mitoz fazlarında bulunan hücre oranı yüksektir. Buna karşın normal dokuda veya düşük grade'li tümörlerde ise nukleolar birleşmenin sağlandığı G_1 ve G_0 dönemlerinde bulunan hücre oranının daha fazla olduğu belirtilmektedir (51). Bu doğrultuda AgNOR farklılıklarının hücre çoğalma hızına ve incelenen hücre topluluğunun hücre siklus faz dağılımına bağlı olarak geliştiği düşünülebilir (51).

Nukleolar birleşmenin tam olarak sağlandığı G_0 döneminde hücrenin metabolik faaliyetine bağlı olarak değişik büyüklükte tek veya az sayıda nukleolus izlenir. Bu nukleoluslar içinde birbiri ile birleşme eğilimi gösteren sayıları hücrenin metabolik faaliyetine göre değişebilen AgNOR noktacıkları bulunur. Buna karşı nukleolar birleşmenin tam olmadığı G_1 evresinde ve nukleolar ayrışmanın gözlemlendiği mitoz evrelerinde AgNOR'lar birbirinden uzak ve dağınık olarak bulduklarından tek tek sayılabilirler. Bu nedenle AgNOR sayısı bu evrelerdeki hücrelerde yüksek bulunabilir. Bu görüşün geçerliliğini araştırmak amacıyla değişik tümoral lezyonlarda AgNOR skoru ile Ki67 indeksi arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ki67 antikoru G_0 evresi dışındaki tüm evrelerde bulunan bir nukleolar antijeni (nukleolar proliferation associated antigen) saptamakta böylece proliferasyon fazındaki hücreleri

belirlemektedir. Meme tümörlerinde (32, 82), Non-Hodgkin's lenfomada (46), beyin tümörlerinde (80), meninjal tümörlerde (91) ve yumuşak doku tümörlerinde (56), AgNOR skoru ile Ki67 indeksi arasında anlamlı ve doğrusal bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Ayrıca meme tümörlerinde östrojen reseptör negatifliği ile AgNOR sayısı arasında da anlamlı ve doğrusal ilişki olduğuna dikkat çekilmiştir (82).

Tonsil dokusunda yapılan çalışmada ; Ki67 ve AgNOR boyamaları aynı kesite uygulanmış ; Ki67 pozitivitesi gösteren hücrelerin Ki67 negatif hücrelere göre çok daha yüksek AgNOR sayısı içerdiği gösterilmiştir. Ki67 negatif hücreler, küçük tek yada az sayıda AgNOR noktacığı içerirken, Ki67 pozitif hücreler çok sayıda dağınık AgNOR noktacığı içermektedir (72). Bu bulgulara karşın akciğer tümörlerinde (35) ve glial tümörlerde (91) Ki67 indeksi ile AgNOR sayısı arasında anlamlı ilişki olmadığını belirten çalışmalarda vardır.

Flow sitometrik çalışmalarda ise proliferatif indeks ile AgNOR değerleri karşılaştırılmış, değişik sonuçlar alınmıştır. Bazı çalışmalarda anlamlı sonuçlar bulunmuş (19), bazılarında ise belirgin bir anlamlı ilişki izlenmemiştir (43). Rektal adenokarsinomlarda ise anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (45). Çoğalma hızı, çift katına ulaşma zamanı (doubling time) farklı iki nöroblastom hücre kültüründe yapılan çalışmada çoğalma hızı ile AgNOR sayısı arasında anlamlı ve doğrusal bir ilişki izlenmiştir. Kültür ortamındaki serum yoğunluğu arttırıldıkça çoğalma hızı artmakta, çift katına ulaşma zamanı kısalmakta AgNOR sayısı artmaktadır (28). Diğer bir çalışmada ise 12 farklı tümör hücre kültüründe timidin (H^3) işaretleme yöntemi kullanılarak çoğalma hızları ölçülmüş, çoğalma hızı ile

AgNOR sayısı arasında ileri derecede anlamlı ve doğrusal bir ilişki gözlenmiştir (35).

4) Hiperploidi : rDNA'ların ve AgNOR proteinlerinin akrosentrik kromozomlar üzerinde bulunması nedeniyle AgNOR yönteminin ploidiyi yansıtabileceği düşünülmüştür. Flow sitometri ile yapılan bazı çalışmalarda , DNA ploidişi ile AgNOR sayısı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (71, 95). Buna karşılık AgNOR ile ploidi arasında anlamlı bir ilişki bulamayan çalışmalarda vardır (19, 45, 46, 68, 83).

Derenzini ve arkadaşları gerçek kromozomal değerlendirme yapmak amacıyla tümör hücre kültürlerinin karyotipik incelemelerini yapmışlardır. Bu çalışmada çoğalma hızları ve interfazik AgNOR değerleri birbirinden çok farklı iki nöroblastom hücre kültürü incelenmiştir. Bu iki farklı tümör kültürü arasında kromozom sayısı ve metafazik AgNOR değerleri açısından farklılık gözlenmiştir (28).

Bir çalışmada metafazda AgNOR proteinlerinin büyük ölçüde kaybolduğu gözönüne alınarak ve rRNA problemleri kullanılarak gerçek metafazik NOR sayıları incelenmiştir. İki tümör tipi arasında belirgin fark gözlenmemiştir. Bu iki nöroblastom klonu arasındaki interfazik AgNOR farklılığının ploidiye bağlı olmadığı; interfazik AgNOR farklılıklarının metafazik AgNOR değerlerine yansımadağı belirtilmiştir (35).

Jan Mohamed ve arkadaşları yüksek ve düşük grade'li lenfomalarda yaptığı benzer çalışmada, interfazda gözlenen AgNOR farklılığının metafazda saptanmadığını, interfazik AgNOR farklılıklarının tekbaşına AgNOR'la açıklanamayacağını belirtmişlerdir(51). Başka araştırmacılarda bunları desteklemiştir. Bazı lösemi ve solid tümörlerde yapılan çalışmalarda da normal ve tümöral hücre metafazları arasında AgNOR farklılıkları gözlenmemiştir (90).

Delozier ve arkadaşları testis tümörlerinde yaptığı çalışmada metafaz kromozom yaymalarında D ve G grubu kromozomlar dışında anormal yerleşimli AgNOR'ların bulunduğunu bildirmiştir (26). Ancak Jan Mohamed ve arkadaşları lenfomalarda yaptığı çalışmalarda interfazik AgNOR farklılıklarının anormal lokalize AgNOR'lardan kaynaklanmadığını belirtmiştir (51).

AgNOR artışının sentez fazında, rDNA'nın duplikasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülebilir. Nitekim, sentez (S) fazı belirleyicisi olarak bilinen bromohegzoüridin antikoru kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda S faz fraksiyonu ile AgNOR sayısı arasında doğrusal, anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (76, 91). Ancak S fazı hücre siklusunun çok küçük bir dilimini oluşturmaktadır bu nedenle hücrelerin çoğunun S fazında bulunarak AgNOR ortalamasını yükselttiğini söylemek güçtür (90). Glial tümörlerde bromohegzoüridin indeksi ile AgNOR skoru arasında ilişki kurulamamıştır (91). Ayrıca DNA duplikasyonu için uyarılmış hücrelerde interfazik AgNOR sayısındaki artışın sentez fazının başlamasından önce gerçekleştiği bildirilmiştir (35).

Suresh ve arkadaşları değişik plasental trofoblastik hücrelerde yaptığı çalışmalarda AgNOR farklılığının ploidi ile ilişkili olduğunu, proliferatif aktivite ile ilişkili olmadığını ileri sürmüştür. Ancak AgNOR değerlendirmelerinin yapıldığı dokularda karyotipik çalışma uygulanmamış, çoğalma hızı belirlenmemiş, AgNOR değerleri teorik bilgiler ışığında yorumlanmıştır (95). Sonuçta karyotipik çalışmalar ve özellikle flow sitometrik çalışmalar hücreler arası AgNOR farklılıklarının hücresel ploidi farklılıklarından kaynaklanmadığı görüşünün genel olarak kabul edilmesini sağlamıştır.

5) Hücresel farklılaşma derecesi : Primitif hücreden olgun hücrelere gidildikçe AgNOR sayısında azalma dikkati çekmektedir. Bu değişiklik çoğalma hızındaki azalmanın bir sonucu olabilir. Kemik iliği hücrelerinde olgunlaşma ve tam farklılaşma ile birlikte AgNOR sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (73). Yaşlanma ile birlikte periferik kan lenfositlerinde AgNOR sayısı azalmıştır (24). Fitohemaglütinin ile blastik değişime uğrayan lenfositlerde başlangıçta artan AgNOR sayısı blastik dönemden olgun döneme geçildiğinde tekrar azalmıştır (24).

Premiyelositik lösemi kültürü HL-60'da yapılan çalışmada, kültür ortamında farklılaşmayı sağlayan ajan dimetil sülfoksit (DMSO) katıldığında farklılaşma ile birlikte AgNOR sayısında azalma izlenmiştir (35). Melanom hücre kültürü HXG-2 ortamına DMSO, retinol , retinoik asid gibi farklılaştırıcı maddeler katıldığında farklılaşma yönünde değişiklikler ve çoğalma hızında yavaşlama ile birlikte AgNOR sayısında azalma gözlenmiştir (35).

Hem rDNA aktivitesi hemde çoğalma hızı, hücrenin farklılaşma düzeyine göre değişiklikler gösterecektir. AgNOR farklılıklarının asıl nedeni olasılıkla rDNA aktivitesindeki ve çoğalma hızındaki farklılıklardır. Bugüne kadar hücresel farklılaşmanın AgNOR sonuçlarına etkileri daha çok metafaz kromozom yaymalarında incelenmiştir. Bu çalışmalarda ele alınan metafazik AgNOR değerleri bir önceki interfazdaki rDNA aktivitesini yansıtmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalar hücresel farklılaşma düzeyi-rDNA transkriptif aktivitesi-AgNOR ilişkisini değerlendirmektedir. Hücresel farklılaşma-proliferatif aktivite-AgNOR ilişkisini değerlendirmek için interfazik AgNOR çalışmalarında ele alan ayrıntılı çalışmalara gerek vardır. Ayrıca farklılaşma

düze yi ile AgNOR skoru arasındaki ilişkilerin temelinde rDNA segmentlerini etkileyen gen çoğalımı veya baskılama mekanizmalarının ne derece etkili olduğu bilinmemektedir. Bu konuda, olgunlaşma gösteren tümör hücre dizilerini ele alan ayrıntılı genetik incelemelere gerek vardır.

Hücreler arasındaki AgNOR farklılıklarının nedenini araştırmak amacıyla nöroblastom - ganglionöroblastom - ganglionörom tümör serisi ve normal ganglion hücreleri metil green pironin ve AgNOR yöntemleri kullanılarak incelenmiş. Primitif nöroblastik hücreden olgun ganglion hücrelerine doğru gidildikçe proliferatif aktivitenin azaldığı kabul edilen bu hücre serisinde total AgNOR sayısının matürasyonla beraber giderek azaldığı buna karşılık nukleolar ve stoplazmik RNA düzeyinin giderek arttığı gözlenmiştir (35). Bu nedenle incelenen hücre serisinde, AgNOR sayı farklılığının tek başına rDNA aktivitesindeki değişikliklere bağlanamayacağı sonucuna varılmış. Proliferatif aktivitesi giderek azalan bu tümör serisinde AgNOR sayısında buna paralel olarak azalmış olması "interfazik AgNOR sayısının rDNA aktivitesinden çok proliferatif aktiviteye bağlı olarak değiştiği" fikrini desteklemektedir. Bu görüşe göre proliferatif aktivitesi yüksek hücre topluluklarında G_0 fazındaki hücre oranı azalır. Hücrenin önemli bir bölümü nukleolus organizasyonunun tam olarak sağlanamadığı G_1 fazında bulunur. Nukleolar ayrışmanın tam olduğu mitoz evrelerinde bulunan hücre sayısında normale göre artmıştır. AgNOR'lar ya tamamen dağınık ya da prenukleolar cisimcikler halinde genellikle tek tek sayılabilecek şekilde bulunurlar. Bu nedenle ortalama AgNOR sayısı yüksek bulunur. Buna karşılık proliferatif aktivitesi düşük hücre topluluklarında G_0 fazında bulunan hücre sayısı artmıştır. AgNOR'lar G_0

fazında nukleolusları oluşturacak şekilde bir araya gelmişlerdir. Küçük bir alanda sıkışmış kalmışlardır, tek tek sayılmaları güçtür. Bu nedenle AgNOR sayısı düşük kalır.

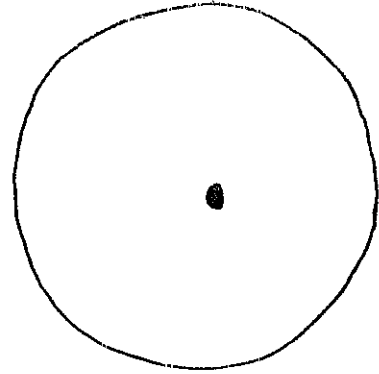
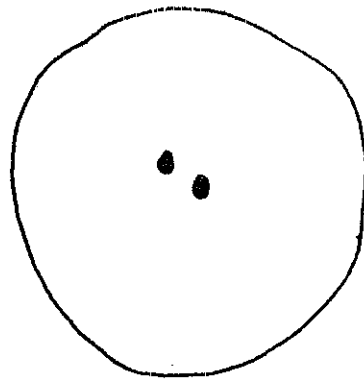
Proliferatif aktivitesi yüksek hücrelerde AgNOR sayısı nukleolar birleşme-ayrışma özelliğine (hücre siklusuna) bağlı iken proliferatif aktivitesi düşük hücrelerde metabolik aktiviteye bağlıdır. Metabolik aktivite arttıkça hücrenin rRNA'ya olan gereksinimi artar. Bu gereksinimi karşılamak amacıyla aktif DNA sayısı ve buna bağlı olarak da AgNOR sayısı artar. Ancak bu tip hücrelerdeki AgNOR'lar proliferatif aktivitesi yüksek hücredeki gibi dağınık halde bulunmayıp nukleolus içerisinde toplu olarak bulunurlar. Proliferatif ve metabolik aktivitesi düşük hücrelerde az sayıda aktif rDNA'nın bir arada topluca bulunması nedeni ile AgNOR'lar tek küçük bir nokta halinde izlenir (örneğin olgun lenfositlerdeki gibi). Buna karşılık proliferatif aktivitesi düşük, ancak metabolik aktivitesi yüksek hücrelerde ise rRNA sentezindeki artış nedeniyle nukleoluslar genişken aktif rDNA sayısındaki artışa bağlı olarak çoğalan AgNOR noktacıkları genişlemiş nukleolus içinde, nispeten birbirlerinden ayrı tek tek seçilebilir halde bulunurlar. AgNOR sayısı proliferatif ve metabolik aktivite göstermeyen hücrelerden daha fazladır (35).

Diagnostik histopatoloji alanında AgNOR yöntemi ile yapılan çalışmaların bir kısmında AgNOR sayısının benign ile malign ayrımını her zaman sağlayamadığı görülmektedir.

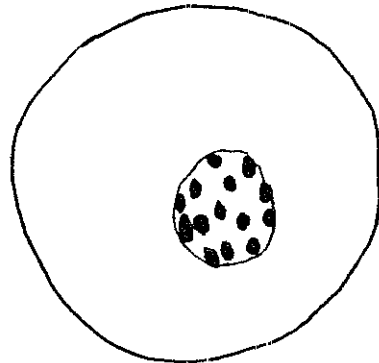
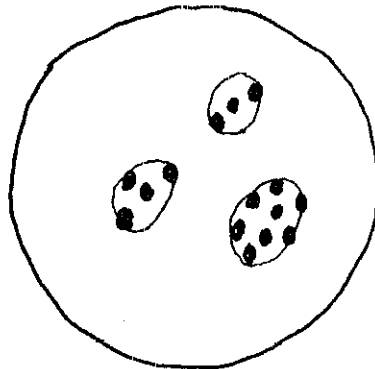
Gerçekten de yüksek düzeyde metabolik veya reaktif karakterde proliferatif aktivite gösteren lezyonlarda AgNOR sayısı malign tümörü düşündürecek kadar artmış olabilir. Bu durumlarda belkide AgNOR organizasyonun tipi gözönüne alınırsa daha iyi sonuç verebilir.

Tam nukleolar ayrışmanın, prenukleolar organizasyonun ön planda olduğu durumlarda daha çok malign lezyon düşünülmelidir. Buna karşılık nukleolar organizasyonun ön planda olduğu AgNOR artışlarında daha çok yüksek metabolik aktivasyon gösteren lezyonların varlığı düşünülmelidir. Tüm bunlara karşı metabolik ve proliferatif aktivasyonun birlikte bulunduğu benign karakterde reaktif lezyonların ; metabolik aktivasyonun da belirgin olduğu nispeten düşük proliferasyon hızı gösteren malign lezyonların da var olabileceği akla gelmelidir (35). (Şekil 5).

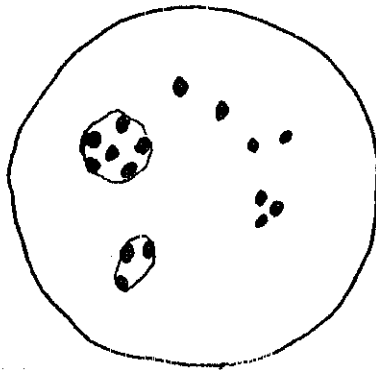
Şekil 5 : Şematize AgNOR dağılım örnekleri



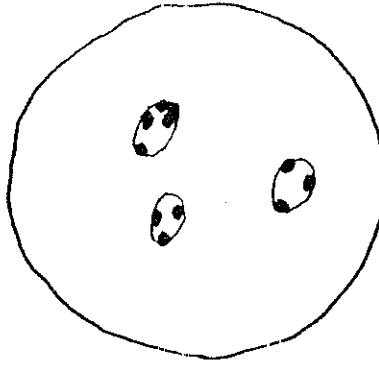
Nukleolar İnaktivasyon Nukleolar İnaktivasyon
a) Düşük düzeyde metabolik ve proliferatif aktivite



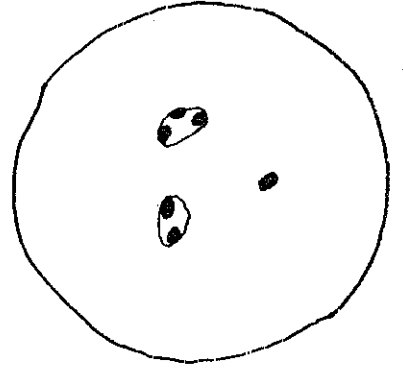
rDNA Aktivite Artışı rDNA Aktivite Artışı
b) Yüksek düzeyde metabolik aktivite



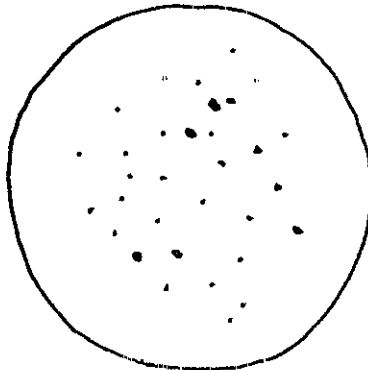
Nukleolar Organizasyon +
Nukleolus Dışı AgNOR



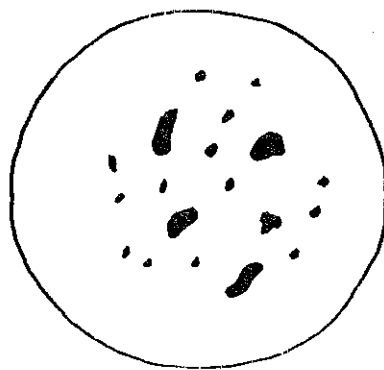
Nukleolar Organizasyon



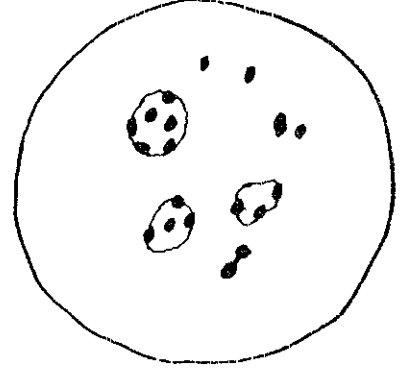
c) Düşük düzeyde proliferatif aktivite



Nukleolar
Ayrışma

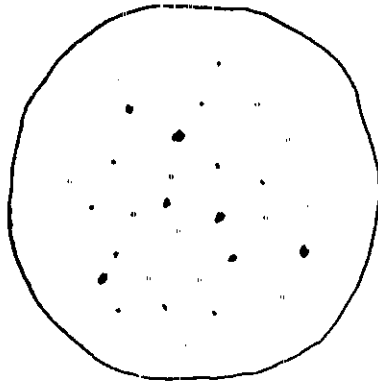


Prenukleolar
Organizasyon

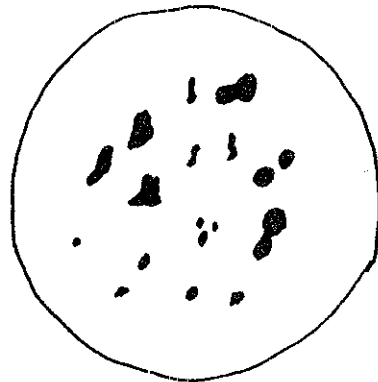


Nukleolar Org. +
Nukleolus Dışı AgNOR

d) Orta düzeyde proliferatif aktivite



Nukleolar Ayrışma



Prenukleolar Organizasyon

e) Yüksek düzeyde proliferatif aktivite

AgNOR bugüne kadar birçok organda çalışılmıştır, bunların bazıları AgNOR'u destekleyen ve faydalı bulan bazıları ise desteklemeyen ve faydasız olarak nitelendiren çalışmalardır. Biz AgNOR'a konu olarak barsağı seçtik ; bunu seçiş nedenlerimiz arasında elimizdeki materyalin çok olması, AgNOR'un barsakta daha iyi sonuçlar vermiş olması ve barsak dokusunda normalden maligniteye geçiş gösterebilen prekanseröz olarak bilinen lezyonların varlığıdır. Böylece hem prekanseröz kabul edilen lezyonların doğruluğunu hemde AgNOR'u barsakta tekrar sınımış olacaktık. AgNOR'un barsakta daha önce yapılmış çalışmalarında gerek benign ile malign ayrımında (15, 17, 30, 68, 86, 99) ve gerekse prognozda başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (13, 45, 53, 68, 77, 86).

Bu aşamada barsak tümörlerinin genel bir sınıflamasının ve mevcut bilgilerin gözden geçirilmesi konuyu daha iyi anlamamız açısından gerekmektedir.

**WHO Klasifikasyonuna Göre Kolon
Epitelial Tümörleri (70) :**

A) Benign ;

1-Adenom

a)Tubuler (adenomatöz polip)

b)Villöz

c)Tubulovillöz

2-Adenomatosis

B) Malign ;

1-Adenokarsinom

2-Müsinöz adenokarsinom

3-Signet-ring sell karsinom

4-Skuamöz sell karsinom

5-Adenoskuamöz karsinom

6-İndifferansiye karsinom

7-Sınıflandırılmayan

Bu genel sınıflamadan sonra farklı kaynaklardan konuyu daha detaylı olarak inceleyebiliriz (12, 25, 41, 58, 69, 85, 100).

Epitelial Polipler ve Genel Özellikleri :

1) Adenomatöz polip (tubuler adenom) ; % 40 sağ kolon, % 40 sol kolon, % 20 rektumda yerleşim gösterir. Yaşla sıklığı artar ve adult otopsilerinde % 30-35 arası saptanır. Familiyal predispozisyon ve otozomal dominant geçişten şüphelenilmektedir. Çoğu asemptomatiktir, genelde çapı 1 cm. kadardır, sessil veya pediküllü, kısa veya uzun aşağıda daha dar bir sap bulundurabilir, tek veya multipl olabilir. Multipl olduklarında bir arada bulunmaya eğilimlidirler. Mikroskopisinde normal mukozayla karşılaştırıldığında gland sayısında artma vardır. Hücreler sıkışmış, yoğun, büyük hiperkromatik nukleusludur ve mitoz sayısında artım vardır. Müsin üretimi oldukça değişken ama genelde azalmıştır. Bazal membran kalınlaşmamıştır. İlk değişiklikler glandların süperfisiyel kısımlarında saptanır. İmmunohistoşimik olarak CEA özellikle de fazla atipik bölgelerde boyanma görülür. Villöz konfigürasyon adenomatöz poliplerde seyrek değildir. Villöz ve adenomatöz komponenti olan ve yaklaşık eşit oranda olup poliplere tubulovillöz veya papiller adenom da denir. Görülen atipi varsa hafif derecede, orta derecede ve şiddetli derecede displazi olarak ayrılır.

Familiyal Polipozis ; Otozomal dominantdır. Sorumlu gen 5.kromozomdur, genelde 2. dekatta ve adenomatöz polipler halinde belirginleşir. Barsağın herhangi bir yerinde normal mukozadan hafifçe yükselmiş geniş kitleler vardır. Bir olguda birkaç tane adenomatöz polibin olması bu tanı için yeterli değildir. Morfolojik olarak minimum 100 polibin görülmesi gerekir, gerçekte çoğu olguda poliplerin sayıları binlercedir. Birçok çalışmada yükselmiş polip epitellerinde ve aradaki mukozada epitel hücrelerinde artmış proliferasyona ait bulgular vardır. Tedavi edilmezse hemen hemen örneklerin hepsinde karsinom gelişebilir. Malign değişiklik fiksasyon veya yüzeyle ülserasyon şeklinde başlayabilir. Karsinom gelişimi sıradan karsinomlardan 20 yıl öncesinde görülebilir, erkenden koloktomi gerektirir.

Gardner Sendromu ; Multipl adenomatöz poliplerle birlikte kafatasında ve mandibulada multipl osteomlar, deride multipl keratinöz kistler, yumuşak dokuda tümörler ve özellikle fibromatozis vardır. Karsinom gelişim riski familiyal polipozis kadar yüksektir.

Turcut Sendromu ; Adenomatöz poliplerin garip kombinasyonları ile birlikte bunlara eşlik eden beyin tümörleri, multipl endokrin noep plazmlar görülebilir.

2) *Villöz Adenom (villöz papillom)* ;Rölatif olarak az sıklıkta görülür. Olguların çoğu daha yaşlı hastalar olup, rektum veya rektosigmoidde tek bir kitle halinde bulunur. Sıvı ve elektrolit eksikliği yapabilir, büyümeye devam ederse barsağı tam tıkar. Çok yumuşak yapıda olduğundan muayenede atlanabilir. Genelde geniş tabanlı, % 10 oranında pediküllü bir sap üzerinde villöz bölgeler ve daha çok villoglandüler polip tipinde görünüm vardır. Mikroskopisinde dallanan villöz çıkıntılar, uzun papiller yapılar

şeklindedir. Müsin yapısı ve CEA reaksiyonu adenomatöz polibe benzer şekilde görülür. Zamanla, bu lezyon yüksek oranda malignleşir (% 29-70 sıklığında) ve malignleştiğinde daha sert bir yapıya dönüşür.

3) **Hiperplastik Polip (metaplastik polip)** ; Karakteristik olarak sessil, küçük boyutta nadiren 5 mm çapı geçer, ancak pedinküle, oldukça büyük, birkaç santimetrede olabilir. Adultlarda % 30-50 oranında dikkatli bir muayene ile saptanabilir. Mikroskobisinde uzamış glandlar, lümene doğru çıkıntılar yapan hücreler ile testere dişi gibi bir görünümü vardır. Mitotik aktivite sadece bazalde artmıştır. Bazal nukleuslar göze çarpmayacak şekilde olup, stoplazma müsinle doludur. Bazal membran kalınlaşmıştır. Yüzey epideli mikropapiller bir görünümde dir . Paneth hücreleri olguların % 8'inde vardır. Boyutlarının artmasıyla, yapısı değişir, farklılaşma görülür, CEA sekresyonu artar, müsin üretimi azalır, fokal adenomatöz değişiklikler izlenir. İverted tipi endofilik bir büyüme örneği olup, mükölaris mukoza içinde büyür, daha çok sağ kolonda olur. Saf hiperplastik poliplerde malignite gelişmez. Ancak multipl hiperplastik polipozis sendromunda büyümeye ve adenokarsinoma eğilimi vardır.

4) **Juvenil Polip (retansiyon polibi)** ; Çocuklarda en sık görülen, ancak olguların 1/3'ünde adultlarda bulunan kolonik poliplerdir. Alışılmış olarak tek ve rektosigmoid bölgede tanımlanır. Ancak birden fazla ve sigmoid kolonun proksimalinde de olabilir. Makroskobik olarak granüler, kırmızı yüzeyle, kistik bir şekilde olup kesit yüzeyinde kafes gibi bir görünümü vardır. Mikroskobisinde yüzeyde genelde ülserasyon ve bunu sınırlamaya çalışan granülasyon dokusu vardır. Hemen altta mukusta dolu kistik genişleme

gösteren atipik özellikler taşımayan glandlar, arada yangılı ve ödemli stroma bulunur. Hiperplastik değişiklikler % 20 olguda saptanabilir. Gerçek neoplazm olarak benzetilmese de bazen karsinoma insitu olgularına da rastlanabilir. Nadiren multipl juvenil polipozis olguları olabilir ve bunlar adenomatöz polip ve adenokarsinomlara eşlik edebilir.

Cronkhite - Canada Sendromu ; Herediter olmayan, juvenil tipte multipl kolorektal polipler ve ektodermal değişiklikler (alopesi, tırnak atrofisi, hiperpigmentasyon) vardır. Bu sendromda adenomatöz değişiklikler ve karsinom olguları gelişebilir.

5) *Peutz - Jegher's Polipozis* ; Hamartomdur, atipi yoktur, glandların organizasyon bozukluğu vardır. Birçok hücre tipi (Paneth hücreleride dahil) ve en önemli değişiklik olarak mükölaris mukozaya ait kas lifleri bulundurur. Bazı olgularda adenomatöz poliplerde olabilir ve kolorektal adenokarsinom gelişebilir.

Cowden Sendromu (multipl hamartom sendromu) ; Otozomal dominant geçiş gösteren mukokutaneöz lekeler, kolorektal polipler ve artmış çeşitli malignite insidansı olan bir hastalıktır. Polipler hamartomatöz niteliktedir.

6) *Transitional Polip* ; Son zamanlarda kullanılan bir deyimdir. Uzamış, genişlemiş kriptlerde artmış mükölaris sekresyonlu goblet hücreleriyle karakterize kolorektal lezyonlardır. Karsinomlara komşu ve diğer tümörlere komşu mukozaya benzer görünüşleri vardır.

Poliplerle Karsinom İlişkileri

- Soliter hiperplastik polipler, retansiyon polipleri, hamartomatöz polipler malignleşmezler veya çok az gözardı edilebilir oranda malignleşirler.

- Polipozis tiplerinin hangisi olursa olsun malignite riski yüksektir. Familiyal polipozis ile Gardner Sendromunda malignite insidansı hemen hemen % 100'dür.

- Villöz adenom malignleşebilir ve olguların çoğunu bunlar yapar (% 29-70).

- Adenomatöz poliplerin tümü malignleşmez ancak malignite riski normalin 20 katıdır.

- Polibin çapı büyüdükçe malignite insidansı artar.

- Polip üzerinde gelişmiş çok sayıda karsinom veya insitu olgusu her zaman için görülebilir.

Karsinomlar ve Genel Özellikleri :

Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, diğer Anglosakson bölgeler ve aşağı Afrika, Asya ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde sıktır. Amerika'da gastrointestinal sistemde en sık görülen ve tedaviye en yatkın karsinomlardır. Özellikle genç siyahlarda daha sıklıkla görülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda çevre faktörünün çok etkili olduğu gösterilmiştir. Daha çok hayvansal proteinli ve yağlı diyetler sonucu intestinal floranın etkilenmesi ve lümen içeriğinin kimyasal bileşimindeki değişiklikleri önemlidir. Özellikle biftek tüketimi ve büyük miktarlarda yağ alımı etkilidir. Ancak tabii ki sonuçta karsinogenezde multifaktöriyel olaylar dizisi söz konusudur. Örneğin ; % 20 olguda sporadik olarak 5.kromozomda bir alel kaybı vardır, aynı özellik familiyal polipozisde de korelasyon göstermektedir.

Epiteliyal poliplerle kolorektal karsinomlar arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Familiyal polipozis ve enflamatuvar barsak hastalıkları (özellikle ülseratif kolit)

ile kolorektal kanserler arasında belirgin bir predispozisyon vardır, ancak bu kolorektal karsinomların genel popülasyonda küçük bir kısmını yapmaktadır. Bu diğer polipozis sendromları için de doğrudur. Bir kısım olguda pelvik radyasyon da (özellikle serviks karsinomlarındaki radyoterapi) sorumlu tutulmuştur. Tanıda biyopsinin yeri çok büyüktür.

Lokalizasyon ve gross özellikler . Tüm karsinomların % 50'si rektosigmoid bölgede olur. Yaşlı hastalarda rölatif olarak sağ taraf tümörleri daha sık görülür. Multisentrik karsinomlar olguların % 3-6'sını yapar. Makroskobik olarak tipik tümörler iyi sınırlı, kenarları yuvarlak, ortası ülser ve büyük kitle şeklindedirler. Normal barsak duvarı ile tümör arasında keskin bir sınır vardır. Genellikle gross görünümü ile mikroskobik kenarlar iyi bir uygunluk gösterir.

Retrograd intramural yayılım % 5 olguda gerçekleşir. Kesit yüzünde tümör grimsi beyaz renktedir ve asıl kitleden uzantılar yapan iyi sınırlı veya parmak şeklinde ilave kısımlar olabilir. Yoğun müsinoz tümörler jelatinöz, parlak görünümlü olarak, normal barsaktan makroskobik olarak ayrılabilir özelliktedir. Makroskobik muayenede tümörün duvarda ne kadar derine indiği, perikolik dokulara geçip geçmediği, ven, lenf, damar invazyonunun olup olmadığı ve barsağın geri kalan kısmında başka tümör, polip bulunup bulunmadığını değerlendirmek önemlidir.

Mikroskobik özellikler . Kolonun karsinomları genelde iyi ile orta derecede differansiye olup değişik oranda müsine sekrete eden adenokarsinomlardır. Kolumnar ve goblet hücrelerinin bir kombinasyonu olup nadiren endokrin hücrelerde katılabilir. Karsinomlar yangı ve desmoplastik reaksiyon geliştirebilirler, bu özellikle tümöre ilave

kısımlarda bulunur. Yangı hücrelerinin çoğu T lenfosittir. Tümör tüm duvarı invaze edip, perikolik yağ dokusuna geçmiş olabilir, perinöral aralıkları ve venleri invaze edebilir. Ven invazyonu prognozda önemlidir bu nedenle elastik boyası veya immunohistokimya (actin) ile takip edilebilir. Nadiren tümör stroması metaplastik kemik formasyonu gösterebilir.

Tümörün devamında rezidüel bir polip odağı görülebilirse de bu genelde az sıklıkta saptanır daha yaygın olarak normal mukozadan, daha uzun, daha kıvrımlı, daha çok goblet hücreleri bulunduran hiperplastik değişiklikler şeklinde bulgular vardır.

Histokimyasal olarak çoğu müsin boyalarıyla pozitif boyanır. İmmunohistokimyasal olarak daima keratinle pozitif boyanır. CEA'yada pozitiflik bir kuraldır. Büyük bir çoğunluğu HCG'ye reaksiyon verir, bu özellikle müsinöz ve az differansiye tümörlerde yaygındır. İmmunoglobulinin sekretuar komponentine immun yanıt olguların yarısında ve özellikle iyi differansiye tümörlerde güçlü bir şekilde vardır. Ayrıca LEA (Large eksternal antigen) ve p21 onkojen antijenleride immunohistokimyasal olarak kullanılabilir. Ultrastrüktürel olarak hücre membranına doğru giden belirgin mikroflament birikimi ve hücre membranından giren fırçamsı kenarlı hücreler vardır. Ancak bu özellik mide, küçük barsak, safra kesesi ve pankreas karsinomlarında da olduğundan diagnostik değildir.

Diğer mikroskobik tipler arasında ; müsinöz, signet-ring sell, bazaloid karsinom tipleri yanısıra skuamöz, clear sell, koryokarsinomatöz ve endokrin differansiasyonu gösteren şekilleri vardır. Müsinöz karsinom % 15 sıklıkta olup, genelde rektumda, villöz adenom, ülseratif kolit, kolit, pelvik radyasyonla ortaya çıkmış

olabilir. Signet-ring sell karsinom genelde genç hastalarda sıktır ve çok az görülen bir tümördür.

Stage'leme sistemleri : Duke's 1937'de bir stage'leme sistemi oturtmuştur. Genelde geniş bir kullanım alanı kazanmıştır ve prognozla direkt ilişkilidir.

Duke's stage'leme sistemi

-Stage A ; Tümör sadece barsak duvarındadır.

-Stage B ; Duvarı aşmış serozaya ulaşmamıştır.

-Stage C ; Lenf nodu metastazı vardır. Stage C₁'de bölgesel lenf nodları Stage C₂'de uzak lenf nodu tutulumu vardır. Sonradan D Stage'i ilave edilmiştir, bu ise uzak organ metastazını gösterir.

Sonradan 1954'de Astler ve Coller'de bir stage'leme sistemi yapmışlarsa da Duke's kadar kullanım alanı bulamamıştır.

Ayrıca American Joint Comitte on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre le Cancer'de (UICC) INM sistemi yapılmış ama bunlarında prognostik açıdan Duke's klasifikasyonundan daha fazla anlamlı olmadığı ve daha karışık olduğu sonucuna varılmıştır.

INM Sistemi ;

T₀ - Primer tümör bulgusu yok

T_{is} - Karsinoma insitu

T₁ - Tümör submukozayı tutmuş

T₂ - Tümör mükölaris mukozayı tutmuş

T₃ - Tümör subserozaya kadar tutmuş

T₄ - Tümör visseral peritonu aşmış ve diğer organ, dokuları tutmuştur.

- N_0 - Lenf nodu metastazı yok
 N_1 - 1-3 arası perikolik veya perirektal lenf nodu tutulumu
 N_2 - 4 veya üzeri perirektal veya perikolik lenf nodu tutulumu
 N_3 - Büyük damarlar boyunca lenf nodlarını tutmuştur
 M_0 - Uzak metastaz yok
 M_1 - Uzak metastaz vardır.

AJCC ve UICC Stage'leme Sistemi

| <u>Stage</u> | <u>Grup</u> | <u>5 Yıllık Survive (%)</u> | <u>Duke's</u> |
|--------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------|
| 0..... | T_{is}, N_0, M_0 | 100 | (-) |
| I..... | T_1, N_0, M_0 | 100 | A |
| | T_2, N_0, M_0 | 85 | |
| II..... | T_3, N_0, M_0 | 70 | B |
| | T_4, N_0, M_0 | 30 | |
| III..... | herhangi bir T, N_1, M_0 | 60 | C |
| | " " $T, N_{2,3}, M_0$ | 30 | |
| IV..... | herhangi bir T | 3 | (-) |
| | " " N, M | | |

Patolojik Grade'leme

- Grade I ; İyi derece differansiye adenokarsinom
- Grade II ; Orta derecede differansiye adenokarsinom
- Grade III ; Az derecede differansiye adenokarsinom.

Yayılım ve Metastaz . En çok regional lenf nodlarına ve karaciğere metastaz yapar. Eğer lenf nodu metastazı varsa hemen çevre yakın lenf nodları ve sıklıkla hemen kapsül altındaki venler çok daha dikkatli bir şekilde incelenmelidir. Ayrıca periton, akciğer ve overlere metastaz yapar.

Prognoz : Çoğu serilerde cerrahi tedaviden sonra survive kabaca % 40-60 arasındadır. Başarısız olgularda lokal rekürrens ve regional lenf nodu metastazı olguların % 90'ının üzerinde görülür. Rekürrenslerin % 71'i ilk iki yılda, % 91'i beş yıl içinde gelişir.

Prognozla ilişkili durumlar .

- Hasta yaşı ; çok genç ve çok yaşlı hastalarda kötü prognoz izlenir. Gençlerde prognozun kötü olmasına gerekçe tanının çok geç konulabilmesi, ülseratif kolitiden gelişen olguların çoğunun bu yaşta olması ve signet-ring sell karsinom ile müsinöz tümörlerin çoğunun bu yaşta görülmesidir.

- Seks ; Kadınlarda prognoz daha iyidir.

- Lokalizasyon ; Yapılan bir çalışmada, lokalizasyon minimal değer taşırken bir diğerinde sol kolonda yerleşenlerde en iyi prognoz saptanmıştır. Bir diğer çalışmada sol kolonda yerleşenlerde geç rekürrens izlenmiştir.

- Tümörün multiplisitesi.

- Lokal yayılım ; Bir polipte rastlantısal bir mikroskopik kanser yakalanması hasta için iyi bir durumdur. Tümör mukoza ve submukozada sınırlıysa bu durum daha da iyidir. Ancak serozaya invazyon yaptıkça, giderek prognoz kötüleşir. Ayrıca, duvarın altına yayılım ve lenf nodu metastazı da durumu kötüleştirir.

- Tümör boyutu ; Genelde tümör boyutuyla prognoz arasında bir korelasyon olsada bu her zaman için geçerli olmayabilir. Tümör boyutu arttıkça metastaz insidansı da artar.

- Obstrüksiyon ; Bu özellik Duke's sınıflamasından bağımsız olarak kötü bir prognozu gösterir.

- Perforasyon ; Kötü prognozu gösterir, tümör barsak duvarını aşır, peritona geçer.

- Mikroskobik tip ve grade ; Mikroskobik grade ve prognoz arasında belirgin bir ilişki vardır. Mikroskobik tipler içinde müsinöz karsinom, küçük hücreli karsinom ve signet-ring sell karsinom belirgin olarak alışılmış en sık görülen sıradan adenokarsinomlardan daha kötü prognoz gösterirler.

- Tümör kenarları ve doku reaksiyonu ; Kenarındaki dokuyu iten tümörler, çevrede çevre dokuyla arasında yangı bulunduran tümörler daha iyi prognoza sahiptirler.

- Euzinofilik infiltrasyon ; Tümör stromasında euzinofil infiltrasyonunun olması daha iyi prognoza işaret ettiği iddia edilmektedir.

- Vasküler ve perinöral invazyon ; Her ikisinde kötü prognoza işaret eder.

- Lenf nodu tutulumu ; Belirgin bir şekilde kötü prognozu gösterir. Spratt ve Spjut'un çalışmasında 6'dan fazla lenf nodu tutulumu varsa hastaların ancak % 10'u 5 yıldan fazla yaşayabilir bulunmuş, 16'dan fazla lenf nodu tutulumu varsa tüm olgular 5 yıl içinde ölür. 6'dan fazla lenf nodu tutulumunda tümör boyutu 2 cm'den az değilmiş. 16 lenf nodundan fazla tutulumda ise tümör boyutu 3 cm'den az değilmiş ve bu tümör boyutu ile lenf tutulumu arasında kabaca bir ilişki sergilenmiş.

- Duke's stage'lemesi ; Bu sistem, lokal yayılım, lenf nodu tutulumunun bir kombinasyonudur. 5 yıllık yaşam oranı Duke's A'da % 90 ve üzeri, Duke's B'de % 50-65 arası, Duke's C'de % 15-25 arası bulunmuş.

- Lenf nodu reaksiyonu ; Bölgesel lenf nodlarında hücreyel immun yanıtın arttığı olgularda (parakortikal immunoblastlarda artım veya sinüs histiyositozis) bunları göstermeyen olgulara göre survive daha uzundur.

- DNA ploidi ; Flow sitometrik araştırmalar Duke's stage'lemesi ve mikroskobik differansiasyon grade'i arasında ilişki olduğunu göstermiştir.

- Onkojen varlığı ; Daha önceki çalışmalarında C-myc onkojeninin varlığı ile tümör differansiasyonunun derecesi arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür.

MATERYAL METOD

Bu çalışmada 1982-1992 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında histopatolojik olarak değerlendirilmiş barsak biyopsi ve ameliyat materyallerinde AgNOR boyama yöntemini uyguladık. Bu çalışmadaki amacımız AgNOR boyama yönteminin geçerliliğini ve barsakta prekanseröz kabul edilen lezyonların bu yöntemle nasıl bir sonuç vereceğini araştırmaktır.

Çalışmamızda 103 olgudan 130 preparat değerlendirildi. Normal barsak olarak cerrahi sınırları, maligniteye dönüşebilme riski olduğundan prekanseröz kabul edilen adenomları, gerek adenomdan kaynağını alan tümörleri ve gerekse de salt tümörleri inceledik. Ayrıca adenomların malignleşme potansiyellerine karşılık bu riski taşımayan juvenil ve hiperplastik polipleride karşılaştırabilmek için çalışmamıza dahil ettik.

Tüm doku örnekleri % 10'luk formalinle fikselenmiş ve parafine gömülmüş dokulardır.

Boyama Yöntemi ;

Doku kesitleri 3µ olarak önceden alkolle temizlenmiş lamlara bidistile suyla doldurulmuş su banyolarından alındı. Deparafinizasyon için ksilol ve derecesi giderek düşen alkollerden geçirdikten sonra bidistile su ile bolca yıkadık.

AgNOR çalışma solüsyonunu Crocker'in modifiye yöntemini kullanarak hazırladık (21). Buna göre boyama solüsyonunun 2 ölçüğünü oluşturacak şekilde filtreden geçirilen % 50'lik sıvı gümüş nitrat solüsyonu ile 1 ölçüğünü oluşturacak şekilde filtreden geçirilen % 1'lik formik asitde çözünen % 2'lik gelatinin karışımıyla elde edildi.

Bu çalışma solüsyonu boyama aşamasında gerek bizim çalışmalarımızda ve gerekse de literatürdeki bilgiler doğrultusunda optimal süre olarak saptanan 27 dakika süresince kesitler üzerine damlatılmak suretiyle karanlık ortamda ve oda ısısında uygulandı. Bu süre sonunda kesitler bolca bidistile su ile yıkandı.

Boyanın internal kontrolünde lenfositlerde ve stromal hücrelerdeki 1 AgNOR noktacığının boyanmasını esas aldık.

Gümüş boyasını kalıcı kılmak için % 5'lik sodyum tiyosülfatta 5 dakika beklettik ve tekrar bolca bidistile su ile yıkadık (10, 32, 96). Son aşamada düşük dereceli alkollerden ve ksilollerden geçirdikten sonra balsam ile kesitleri kapattık.

Zıt boya, immunohistokimyasal boyamalar uygulamadık.

Sayma Yöntemi ;

Değerlendirme olguların tanısına bakılmaksızın farklı zamanlarda iki patolog tarafından immersiyon objektifte 1000 büyütme altında yapıldı. AgNOR noktacıkları kahverengi, siyah olarak görüldü. Tüm olgularda ayırt edilebilen, görülebilen intra ve ekstranukleolar noktacıkların hepsi boyutlarına bakılmaksızın sayıldı. Her olguda total 100 hücrede sayım yapıldı, iki gözlemci arasındaki fark % 10'dan azdı.

BULGULAR

Bu çalışmada değerlendirilen 103 olgudaki 130 preparatın gruplara göre dağılımı, grupların farklı özellikleri ve sonuçları aşağıdaki gibidir :

A) Cerrahi sınır olarak aldığımız 21 olgudan 21 preparatın incelenmesinde ;

Olgular yaşları 24-76 (ortalama 48,9) yaş arasında değişen 11 erkek, 10 kadından oluşmuştu. Bu cerrahi sınırların alındıkları tümöre göre dağılımı 6 iyi derecede differansiye adenokarsinom, 3 iyi derecede müsinöz adenokarsinom , 8 orta derecede differansiye adenokarsinom, 2 orta derecede differansiye müsinöz adenokarsinom, 2 az derecede differansiye adenokarsinom şeklinde idi.

AgNOR noktacıkları hücre başına 1-11 arasında değişmekte olup, ortalaması 3,55 ve standart erroru (\pm) 1,35 olarak saptandı.

B) Juvenil polip ve hiperplastik polip aynı grup içinde değerlendirildi. Juvenil polipte 5 olgudan alınan 6 preparat incelendi. Olgular yaşları 5-10 (ortalama 6,6) arasında değişen 4 erkek, 1 kızdan oluşmakta idi. Lokalizasyonların tamamı rektumda yerleşmiş, 1 olguda displazi ve metaplazi olduğu görülmüyordu.

Hiperplastik polipte ise 5 olgudan alınmış 5 preparat vardı. Yaşları 9-40 (ortalama 33) olan 3 kadın, 2 erkek olgunun lokalizasyonları 1 rektosigmoid bileşke dışında tamamı rektumdaydı. 1 olguda orta derecede displazi, 2 olguda şiddetli derecede displazi vardı.

AgNOR noktacık sayıları hücre başına juvenil polipte 1-9 arasında değişirken, hiperplastik polipte ise 1-6 arasında değişmekteydi. Her ikisinde yakın sonuçlar verdiklerinden bir grup olarak incelenmeye alındı. Buna göre AgNOR sayısı ortalaması 2,16 standart erroru (\pm) 1,78 olarak saptandı.

C) Malignleşme insidansı taşıdıklarından adenomatöz polip ile tubulovillöz adenom aynı grup altında değerlendirildi.

Adenomatöz polipte 11 olgudan alınan 14 preparat değerlendirildi. Olguların 6'sı kadın, 5'i erkek ve yaşları 23-80 (ortalama 40,9) idi. 9 olgu rektumda, 1 olgu sol kolonda, 1 olgu sigmoidde lokalizeydi. 1 olguda hafif derecede displazi, 1 olguda orta derecede displazi, 2 olguda ileri derecede displazi vardı.

Tubulovillöz adenomda ise 5 erkek, 2 kadından oluşan 7 olgudan alınan 10 preparat incelendi. Yaşları 13-60 (ortalama 45,2) arasında değişen olguların lokalizasyon dağılımı 5'i rektumda ve 2'si rektosigmoid bölge şeklinde idi. 5 olguda şiddetli derecede displazi vardı.

Hücre başına AgNOR sayısı adenomatöz polipte 1-12, tubulovillöz adenomda 1-15 arasında değişiyordu. Her iki grubun AgNOR ortalaması 4,68, standart erroru (\pm) 4.09 olarak saptandı.

D) Bu grupta gerek adenom tabanından gelişmiş tümörü bulunduran ve gerekse tümöre eşlik eden adenom olgularını inceledik. Böylece bu grup altında adenomdan tümöre geçişi saptamaya çalıştık.

Burada yaşları 5-70 (ortalama 46,1) arasında değişen 3 kadın ve 3 erkekten oluşan 6 olgudan alınan 12 preparat incelendi.

Lokalizasyonları 1 sigmoid, 1 rektosigmoid bölge dışında tümü rektumda idi. Olguların 5'i tubulovillöz adenom, 1'i adenomatöz polip tipindeydi. Adenomlara eşlik eden tümör tiplerinin dağılımı ise ; 2 iyi derecede differansiye adenokarsinom, 1 iyi derecede differansiye müsinöz adenokarsinom, 2 orta derecede differansiye adenokarsinom, 1 orta derecede differansiye müsinöz adenokarsinom şeklindedir.

Hücre başına düşen AgNOR noktacık sayısı 1-18 arasında değişirken ortalama AgNOR sayısı 6,77 ve standart erroru (\pm) 4,55 olarak saptandı.

E) Tümörleride kendi aralarında differansiyasyonlarına göre alt gruplara ayırdık. İyi derecede differansiye adenokarsinom grubunda yaşları 24-78 (ortalama 58,2) arasında değişen 6 kadın ve 7 erkekten oluşan 13 olgudan alınan 18 preparat incelendi. Değerlendirilen 13 olgunun 4'ü biyopsi materyali olup, stage'lemesi yapılamazken, biyopsi dışında kalan ameliyat materyallerininin 1'i Duke's A, 2'si Duke's B, 6'sı Duke's C grubundaydı. 4'ünde lenf nodülü metastazı saptanan olguların lokalizasyon dağılımı 6'sı rektum, 3'ü çekum, 2'si rektosigmoid bölge, 2'si sigmoid bölge şeklindeydi.

Hücre başına AgNOR noktacığı sayısı 3-20 arasında değişirken ortalama AgNOR sayısı 9,56 ve standart erroru (\pm) 2,62 olarak saptandı.

F) Orta derecede differansiye adenokarsinom grubunda yaşları 29 - 60 (ortalama 48,2) arasında değişen, 6 erkek , 8 kadından oluşan 14 olgudan alınan 19 preparat incelendi. 2'sinde lenf nodülü metastazı olan, 1'i dışında tümü ameliyat materyali olan 14 olgunun lokalizasyon dağılımı 5 rektum , 4 sigmoid , 2 sağ kolon , 1 sol kolon , 1 çekum,

1 rektosigmoid bölge yerleşimlidir. 1 biyopsi materyali dışında kalan 13 ameliyat materyalinin stage dağılımı ise 1 Duke's A , 8 Duke's B, 4 Duke's C şeklindedir.

Hücre başına görülen AgNOR noktacığı sayısı 5-22 arasında değişirken ortalama AgNOR sayılı 11,51 ve standart erroru (\pm) 2,65 olarak bulundu.

G) Az differansiye adenokarsinom grubunda 2 kadın, 5 erkekten oluşan, yaşları 19-76 (ortalama 51,8) olan 7 olgudan alınan 10 preparat incelendi. 3 lenf nodülü metastazı olan ve 2 biyopsi materyalinin dışında kalan 5 ameliyat materyalinin Duke's stage'lemesine göre dağılımı 1'i Duke's B stage'i dışında geri kalanların tamamı Duke's C grubundaydı. Lokalizasyon dağılımı ise 4 rektum, 1 sağ kolon, 2 çekum + sağ kolon şeklindedir.

Hücre başına görülen AgNOR noktacığı 3-24 arasında değişirken ortalama AgNOR sayısı 8,34 ve standart erroru (\pm) 2,37 olarak saptandı.

H) Bu grupta hem olgu sayısının az oluşu ki bu daha çok müsinöz tümörlerin çoğunun kötü boyanmasından kaynaklandı, hemde differansiyasyonları arasında belirgin bir fark saptanmaması üzerine müsinöz adenokarsinomların tümü bir grup olarak değerlendirildi.

Olguların tamamı ameliyat materyali olup, 8 olgudan alınan 10 preparat değerlendirildi. Bunlar 4'ü iyi derecede differansiye müsinöz adenokarsinom, 2'si orta derecede differansiye müsinöz adenokarsinom, 2'si az derecede differansiye müsinöz adenokarsinom şeklindeydi. Olguların 6'sı kadın, 2'si erkek ve yaşları 11-70 (ortalama 49.2) idi. Hiçbirinde metastaz saptanamayan olguların 5'i Duke's B, 3'ü Duke's C stage'indeydi. Lokalizasyon dağılımları ise 3 rektosigmoid bölge, 1 sağ kolon, 1 sağ kolon+çekum, 1 rektum,

1 sol kolon, 1 rektum + sol kolon idi.

Hücre başına 4-17 arasında değişen AgNOR noktacığı saptanan müsinöz adenokarsinomlarda ortalama AgNOR sayısı 9,77 iken standart erroru (\pm) 3,14 olarak bulundu.

I) İleum, jejunum ve kolonda yerleşim gösteren 12 yaşındaki Peutz Jegher's polipozis tanılı erkek olgudan alınan 4 preparatın incelenmesinde AgNOR noktacığı sayısı her hücre için 2-12 arasında değişirken ortalama AgNOR sayısı 6,08 olarak bulundu. Bu sonuçla adenomlara yakın bir değer verdi, ancak tek olgu olduğundan istatistiki çalışmaya alınmadı.

J) Birisi 58 yaşında kadın, diğeri 61 yaşında erkek her ikisi de rektumda lokalize 2 indifferansiye karsinom olgusunda AgNOR noktacığı sayısı 3-24 arasında değişiyordu. Birisinde ortalama 7,60 AgNOR noktacığı ile adenomlara, diğesinde 13,79 AgNOR noktacığı ortalaması ile tümörlere yakın değerler verdiler. Ancak, olgu sayısı bu grupta da az olduğundan istatistiki çalışmaya alınmadılar.

Tüm gruplar arasından Peutz Jegher's polipozis ve indifferansiye karsinom grupları dışında kalan 8 grup, Akdeniz Üniversitesi Bilgi İşlem Merkezinde Macintosh LC marka bilgisayar ile Excel programında karşılıklı olarak önce gruplar arası anlamlılık testine alındı. Bu testte herhangi iki grup arasında istatistiki anlam farklılığını ifade eden $p < 0,001$ değeri bulundu. Sonrada bu istatistiki anlamın, hangi gruplarda olduğunu saptamak için, tüm grupların ortalama AgNOR noktacığı sayılarının karşılıklı değerlendirilmesine geçildi. Burada Fisher'in en küçük farkta bile anlamlılık ifade eden ve istatistiki değeri $p < 0,05$ olan testi uygulandı. Bir başka deyişle bu testte gruplar arasındaki % 5'lik bir fark istatistiki

anlamlılık ifade etmektedir.

Ortalama AgNOR noktacığı sayısı en küçük bulunan juvenil polip ve hiperplastik polibi 1. grup olarak alırsak, 2. grup cerrahi sınırlar, 3. grup adenomatöz polip ve tubulovillöz adenom, 4. grup adenom + karsinom, 5. grup iyi derecede differansiye adenokarsinom, 6. grup orta derecede differansiye adenokarsinom, 7. grup az derecede differansiye adenokarsinom, 8. grup tüm müsinoz adenokarsinomlar olarak sıralandırıldı ve karşılaştırıldı.

Sonuçta ; Fisher'in testine göre 5. ve 8. gruplar yani iyi derecede differansiye adenokarsinom grubuyla müsinoz adenokarsinomlar arasında istatistiki anlamlılık bulunamadı. Bunun dışında ise diğer tüm gruplarda, gruplararası istatistiki anlamlılık ($p < 0,05$) ifade eden değerler elde edildi.

AgNOR ile lokalizasyon, yaş, seks, displazi arasında istatistiki anlamlılık bulunamadı. Her ne kadar elimizdeki tüm olguların Duke's stage'lemesi yoktuysa da, mevcut materyallerdeki Duke's stage'lemesi ile AgNOR arasında istatistiki anlam kaydedemedik.

TABLO : 1

Cerrahi sınır ve poliplerin klinikopatolojik özellikleri

| Grup | İncelenen | | Yaş (Ort.) | Cinsiyeti | | Genel Lok. | Displazik Olgu Sayısı |
|------|----------------|--------------------|------------------------|-----------|----|---------------|-----------------------------|
| | Olgu Sayısı | Preparat Sayısı | | K. | E. | | |
| 1 | 21 | 21 | 24 - 76 (ort.:48,9) | 10 | 11 | - | - |
| 2 | 5 | 6 | 5 - 10 (ort.:6,6) | 1 | 4 | Rektum | 1 |
| 3 | 5 | 5 | 9 - 40 (ort.:33) | 3 | 2 | Rektum | 3 |
| 4 | 11 | 14 | 23 - 80 (ort.:40,9) | 6 | 5 | Rektum | 4 |
| 5 | 7 | 10 | 13 - 60 (ort.:45,2) | 2 | 5 | Rektum | 5 |
| 6 | 1 | 3 | 12 | - | 1 | Tüm barsak | - |

Grup 1 : Cerrahi sınırlar

Grup 2 : Juvenil polipler

Grup 3 : Hiperplastik polipler

Grup 4 : Adenomatöz polipler

Grup 5 : Tubulovillöz polipler

Grup 6 : Peutz Jegher's polipozis

NOT :Peutz jegher's polipozis olgusu istatistiki çalışmaya alınmamıştır.

TABLO : 2

Karsinomların klinikopatolojik özellikleri

| Grup | İncelenen | | Yaş (ort.) | Cinsiyeti | | Genel Lok. | Duke's | | |
|------|----------------|--------------------|------------------------|-----------|----|-------------------|--------|---|---|
| | Olgu Sayısı | Preparat Sayısı | | K. | E. | | A | B | C |
| 1 | 6 | 12 | 5 - 70 (ort.:46,1) | 3 | 3 | Rektum | - | - | - |
| 2 | 13 | 18 | 24 - 78 (ort.:58,2) | 6 | 7 | Rektum | 1 | 2 | 6 |
| 3 | 14 | 19 | 29 - 60 (ort.:48,2) | 8 | 6 | Rektum sigmoid | 1 | 8 | 4 |
| 4 | 7 | 10 | 19 - 76 (ort.:51,8) | 2 | 5 | Rektum | - | 1 | 4 |
| 5 | 8 | 10 | 11 - 70 (ort.:49,2) | 6 | 2 | Rektosigmoid | - | 5 | 3 |
| 6 | 2 | 2 | 58 - 61 (ort.:59,5) | 1 | 1 | Rektum | - | - | - |

Grup 1 : Adenom + adenokarsinomlar

Grup 2 : İyi derecede differansiye adenokarsinomlar

Grup 3 : Orta derecede differansiye adenokarsinomlar

Grup 4 : Az derecede differansiye adenokarsinomlar

Grup 5 : Tüm müsinoz adenokarsinomlar

Grup 6 : İndifferansiye karsinomlar

NOT:-Lenf nodülü metastazı; 4 iyi derecede differansiye adenokarsinom, 2 orta derecede differansiye adenokarsinom, 3 az differansiye adenokarsinom olgusunda vardır.
-İndifferansiye karsinom olguları istatistiki çalışmaya alınmamıştır

TABLO : 3

Gruplara göre AgNOR dağılımı

| Grup | İncelenen Preparat sayısı | Max-Min. AgNOR noktacığı sayısı | Ort. AgNOR Sayısı | Standart erroru(±) | Standart deviasyonu |
|----------------------|---------------------------------|--|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1-Cerrahi sınır | 21 | 1 - 11 | 3,55 | 1,35 | 6,21 |
| 2-Juvenil polip | 11 | 1 - 9 | 2,16 | 1,78 | 5,90 |
| Hiperplastik p. | | 1 - 6 | | | |
| 3-Adenomatöz p. | 24 | 1 - 12 | 4,68 | 4,09 | 2,00 |
| Tubulovillöz a. | | 1 - 15 | | | |
| 4-Adenom+Karsinom | 12 | 1 - 18 | 6,77 | 4,55 | 1,57 |
| 5-İyi d.diff.a.kar. | 18 | 3 - 20 | 9,56 | 2,62 | 1,11 |
| 6-Orta d.diff.a.kar. | 19 | 5 - 22 | 11,51 | 2,65 | 1,15 |
| 7-Az d.diff.a.kar. | 10 | 3 - 24 | 8,34 | 2,37 | 7,51 |
| 8-Müsinöz a.kar. | 10 | 4 - 17 | 9,77 | 3,14 | 9,94 |

NOT : İkinci gruptaki juvenil polip ile hiperplastik polip ve üçüncü gruptaki adenomatöz polip ile tubulovillöz adenom aynı gruplar içinde istatistiki çalışmaya alınmıştır.

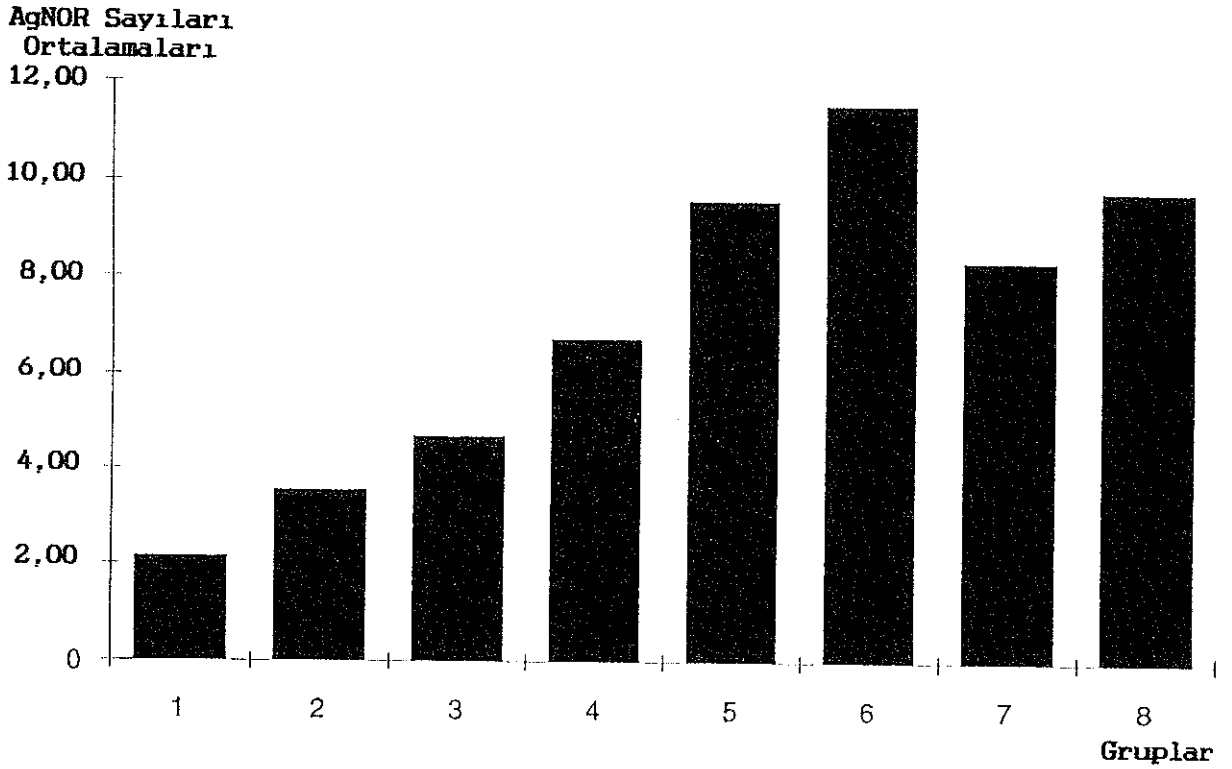
TABLO : 4

Grupların Fisher'in en küçük fark (PLSD) yöntemine göre istatistiki olarak karşılaştırmalı çalışma sonuçları

| Karşılaştırılan Gruplar | A _g NOR Ortalaması Farkı | İstatistiki Sonuç (p < 0.05) |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| G1 - G2 | - 1,38 | Anlamlı |
| G1 - G3 | - 2,51 | Anlamlı |
| G1 - G4 | - 4,60 | Anlamlı |
| G1 - G5 | - 7,40 | Anlamlı |
| G1 - G6 | - 9,34 | Anlamlı |
| G1 - G7 | - 6,17 | Anlamlı |
| G1 - G8 | - 7,60 | Anlamlı |
| G2 - G3 | - 1,13 | Anlamlı |
| G2 - G4 | - 3,22 | Anlamlı |
| G2 - G5 | - 6,01 | Anlamlı |
| G2 - G6 | - 7,95 | Anlamlı |
| G2 - G7 | - 4,79 | Anlamlı |
| G2 - G8 | - 6,22 | Anlamlı |
| G3 - G4 | - 2,09 | Anlamlı |
| G3 - G5 | - 4,88 | Anlamlı |
| G3 - G6 | - 6,82 | Anlamlı |
| G3 - G7 | - 3,65 | Anlamlı |
| G3 - G8 | - 5,09 | Anlamlı |
| G4 - G5 | - 2,79 | Anlamlı |
| G4 - G6 | - 4,73 | Anlamlı |
| G4 - G7 | - 1,56 | Anlamlı |
| G4 - G8 | - 3,00 | Anlamlı |
| G5 - G6 | - 1,94 | Anlamlı |
| G5 - G7 | - 1,22 | Anlamlı |
| G5 - G8 | 0,20 | ***Anlamsız*** |
| G6 - G7 | 3,16 | Anlamlı |
| G6 - G8 | 1,73 | Anlamlı |
| G7 - G8 | -1,43 | Anlamlı |

NOT : Bu tabloda juvenil ve hiperplastik polipler cerrahi sınırlardan daha az A_gNOR gösterdiklerinden 1.grup olarak alınmıştır. Buna göre ; G1 juvenil ve hiperplastik polip, G2 cerrahi sınırlar , G3 adenomlar, G4 adenom+a.karsinomlar, G5 iyi d.diff.a.karsinomlar,G6 orta d.diff. a.karsinomlar, G7 az d.diff.a.karsinomlar, G8 müsinoz a.karsinomları temsil etmektedir

Gruplara göre AgNOR dağılım grafiği



- Grup 1 : Juvenil ve hiperplastik polipler,
Grup 2 : Cerrahi sınırlar,
Grup 3 : Adenomatöz polipler ve tubulovillöz adenomlar,
Grup 4 : Adenom + karsinomlar,
Grup 5 : İyi derecede differansiye adenokarsinomlar,
Grup 6 : Orta derecede differansiye adenokarsinomlar,
Grup 7 : Kötü derecede differansiye adenokarsinomlar,
Grup 8 : Müsinöz adenokarsinomlar.

AgNOR boyanma özellikleri ise şöyleydi ;

AgNOR noktacıkları normal cerrahi sınır hiperplastik polip ve juvenil polipte küçük, yuvarlak, genelde bir veya iki tane olan nukleolus içinde düzenli dağılımlı yuvarlak ve regüler görünümlü idiler.

Adenomlarda ise bazen birkaç tane ve daha büyük olabilen nukleolus içinde sınırlı kalan sayıları ve çapları daha fazla büyük ve pleomorfik AgNOR noktacıkları vardı.

Bunlara karşın tümörlerde bazen kum gibi dağılmış ve çok küçük çapta, fakat kapladıkları alan göreceli daha fazla olan, hem nukleolar hem de ekstranukleolar izlenebilen AgNOR noktacıkları dikkati çekmekte idi.

Aynı süre ve koşullarda boyanmalarına karşın, bazen aynı olgunun değişik preparatlarında farklı sonuçlar alınabildi. Bunda nukleolus detaylarının daha çok ayırt edilip, edilememesi ile birlikte tümör heterojenitesinde rolü vardı.

Genelde sayımı standardize edebilmek için bez epitellerinin boyuna kesitlerini sayım için tercih ettik. Özellikle cerrahi sınırlarda yüzeysel bezlerde sayı daha az iken proliferasyonun başladığı derin bezlerde AgNOR sayıları daha yüksek değerler vermekte idi.

Displazik alanlarda rölatif bir artım izleniyordusa da istatistiki anlam ifade etmedi.

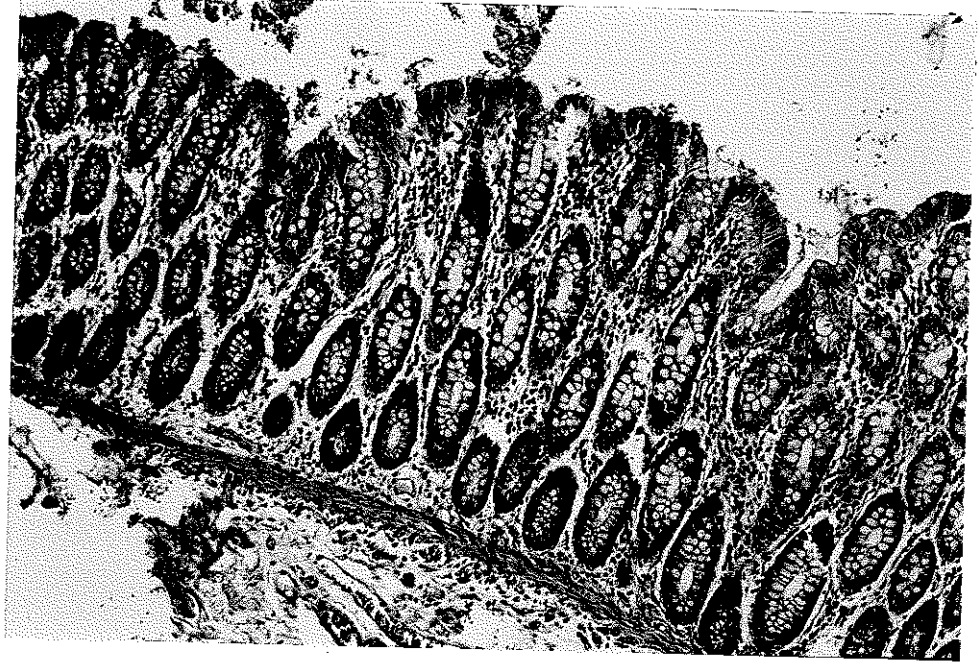
Adenomdan karsinoma geçiş alanlarında AgNOR'ların çaplarında küçülme, diğer adenom + tümör olgularına göre istatistiki anlam içermeyen rölatif bir sayı artımı gösteriyorlardı. Aynı zamanda hemen yakınındaki tümör olmayan alanlara göre nukleoluslarında büyüme ve nukleus zarlarında belirginleşme de dikkati çekiyordu.

Tubulovillöz adenomlarda papiller yapılarda AgNOR sayılarında artım vardı. Nekrozlu alanlardan özellikle kaçınmaya çalıştık, ancak tüm dokuda yaygın nekroz olan olgularda düşük AgNOR sayıları saptadığımızdan yanılgiya neden olmaması için, bu olguları çalışmamıza dahil etmedik.

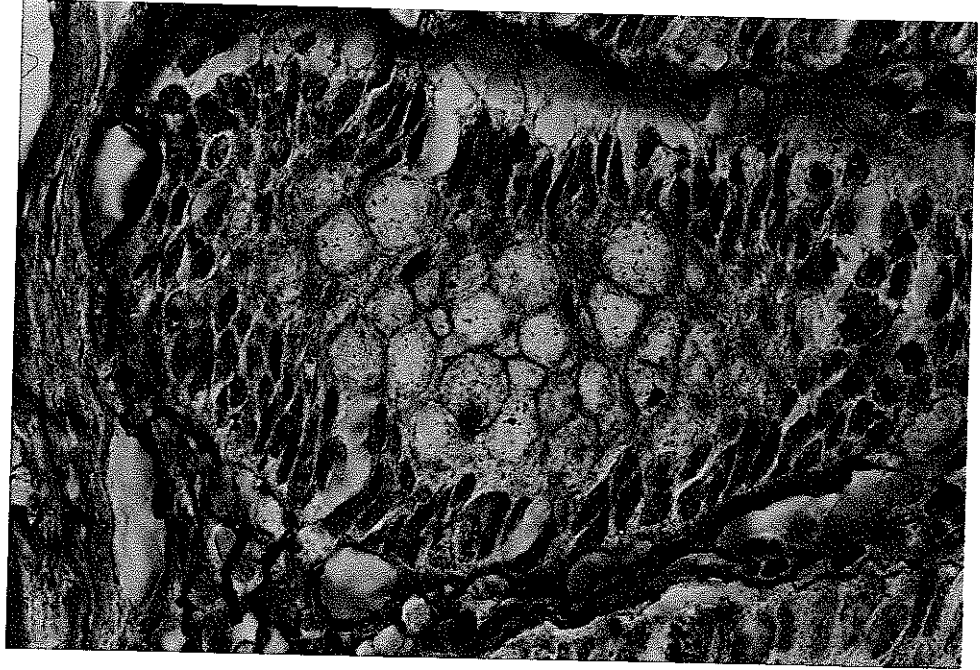
Müsinözlerin çoğunda differansiyasyonu ne olursa olsun nukleus detayları net izlenemeyen bir boyanma olduğu dikkati çekti. Bu nedenle boyamadan önce çok daha fazla örnek aldığımız müsinöz grubundan değerlendirmeye ancak 10 preparat alabildik.

Biyopsi materyalleri ameliyat materyallerine göre daha iyi boyanma gösterdiler. Eski yıllara ait doku örneklerinde genelde daha yoğun bir formalin pigmenti çöküntüleri ve buna bağlı daha kötü boyanmalar elde edildi.

Genelde olmasa da bizi rahatsız eden bir diğer konu, bazen zemin boyanması oldu ve bunu biz genelde literatürlerde bahsedilen 20-25°C'lik ortamda değilde, bazı günler 28-30°C'lik ortamda çalışmak zorunda kalmamıza bağladık. Bu nedenle önceden seçtiğimizden daha az sayıda preparatı çalışmamıza aldık.



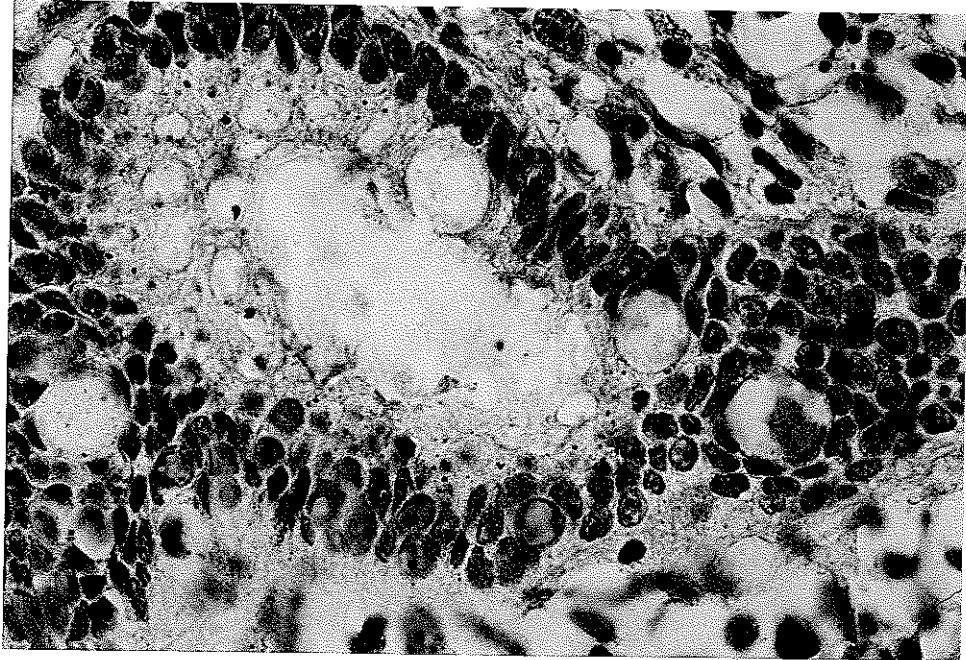
Resim 1 : Cerrahi sınır, H.E. (10 x 10)



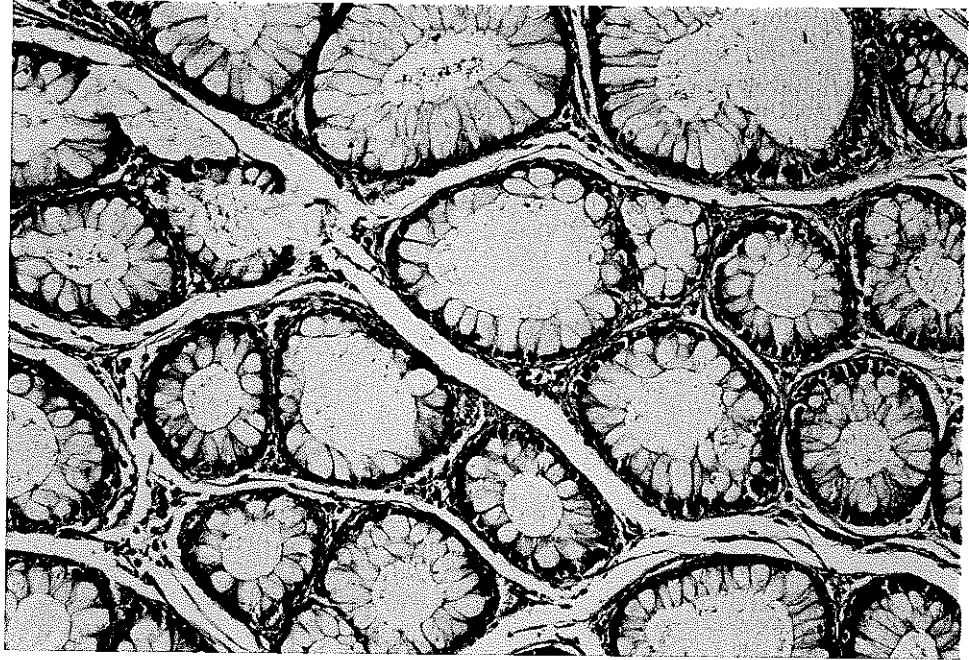
Resim 2 : Cerrahi sınır, AgNOR (10 x 100)



Resim 3 : Juvenil polip, H.E. (10 x 10)



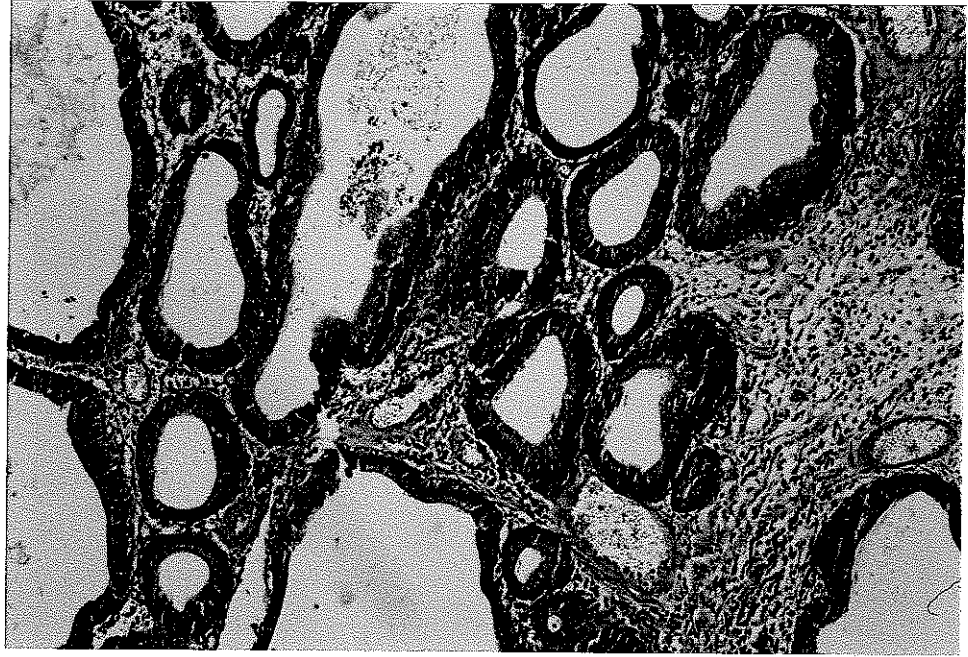
Resim 4 : Juvenil polip, AgNOR (10 x 100)



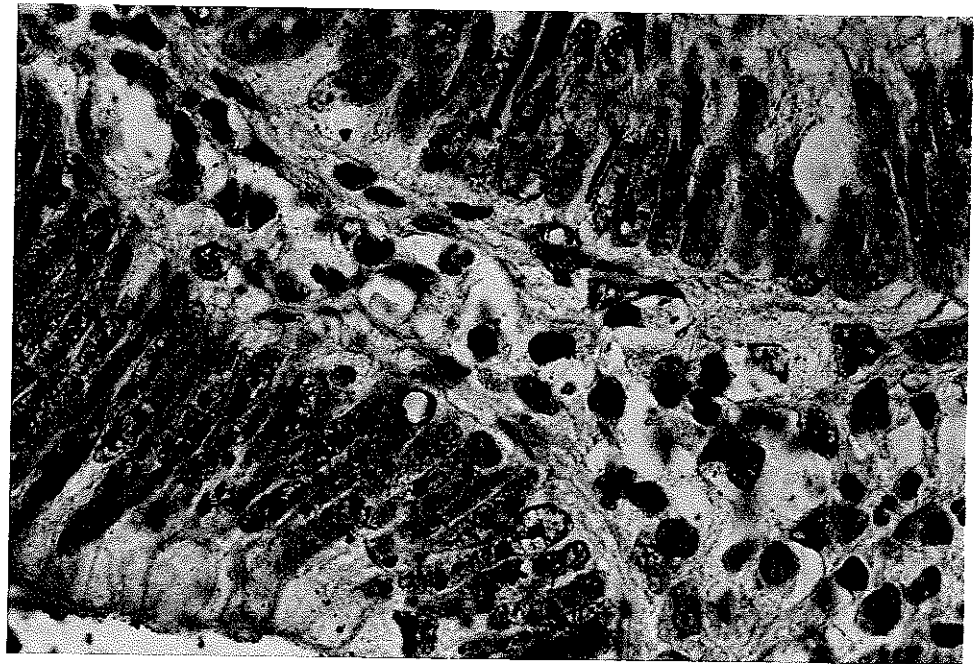
Resim 5 : Hiperplastik polip, H.E. (10 x 20)



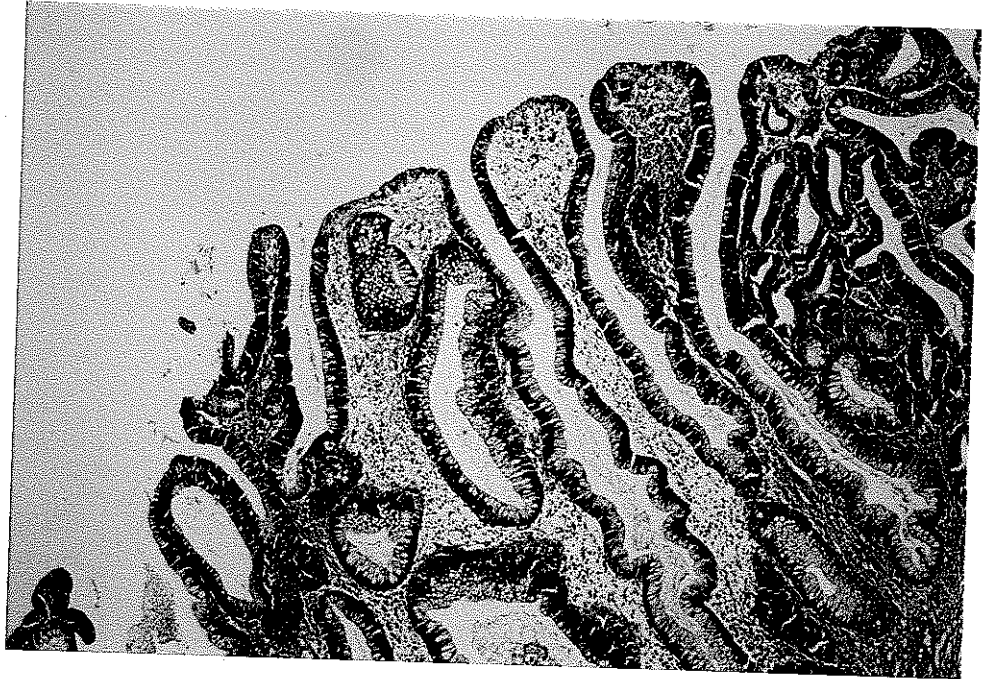
Resim 6 : Hiperplastik polip, AgNOR (10 x 100)



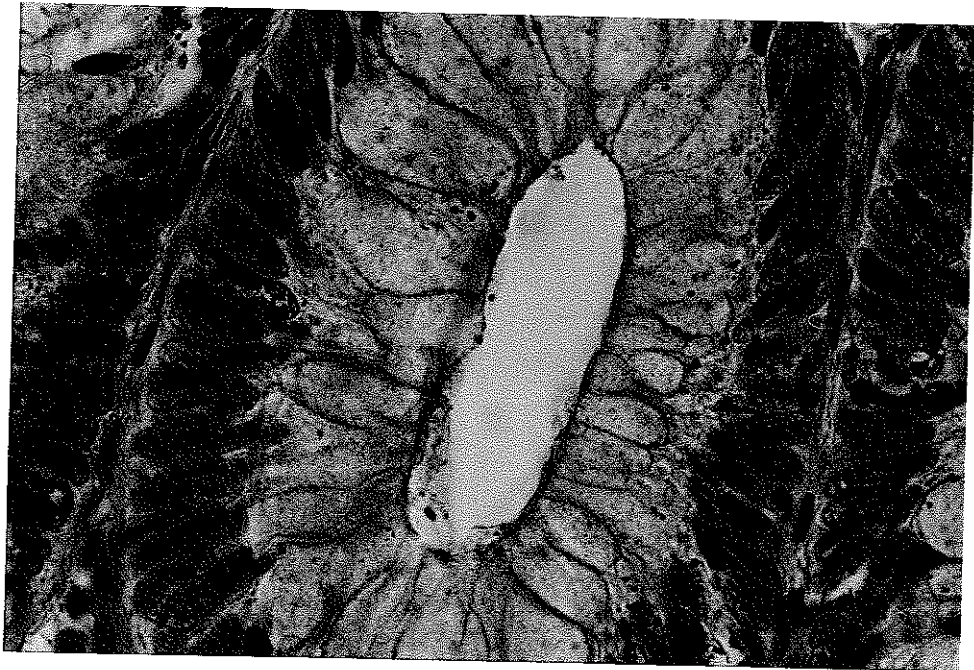
Resim 7 : Adenomatöz polip, H.E. (10 x 10)



Resim 8 : Adenomatöz polip, AgNOR (10 x 100)



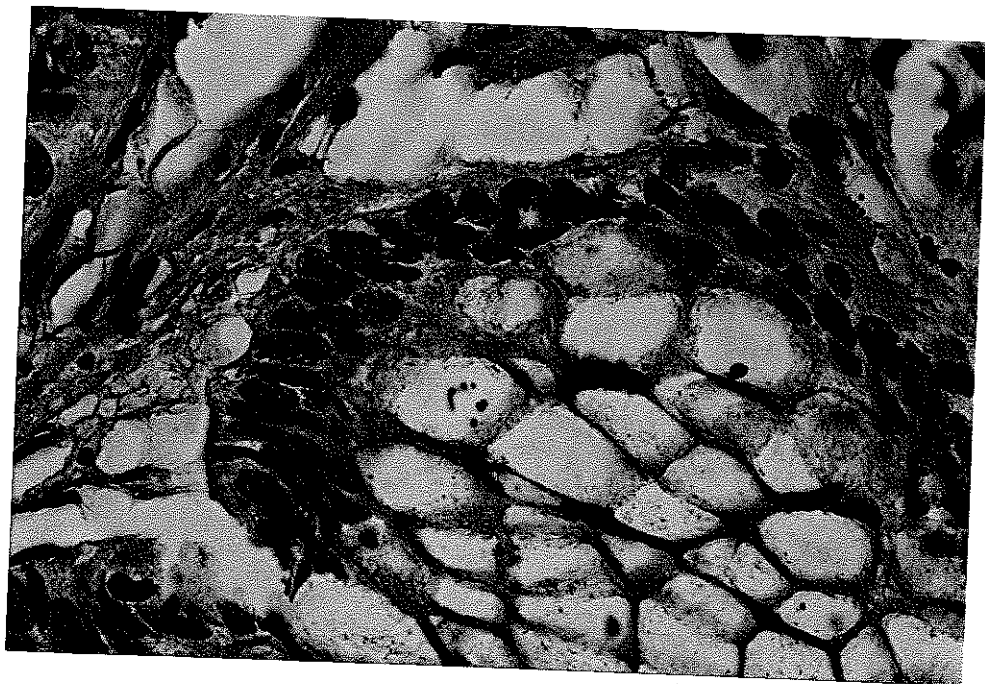
Resim 9 : Tubulovillöz adenom, H.E. (10 x 5)



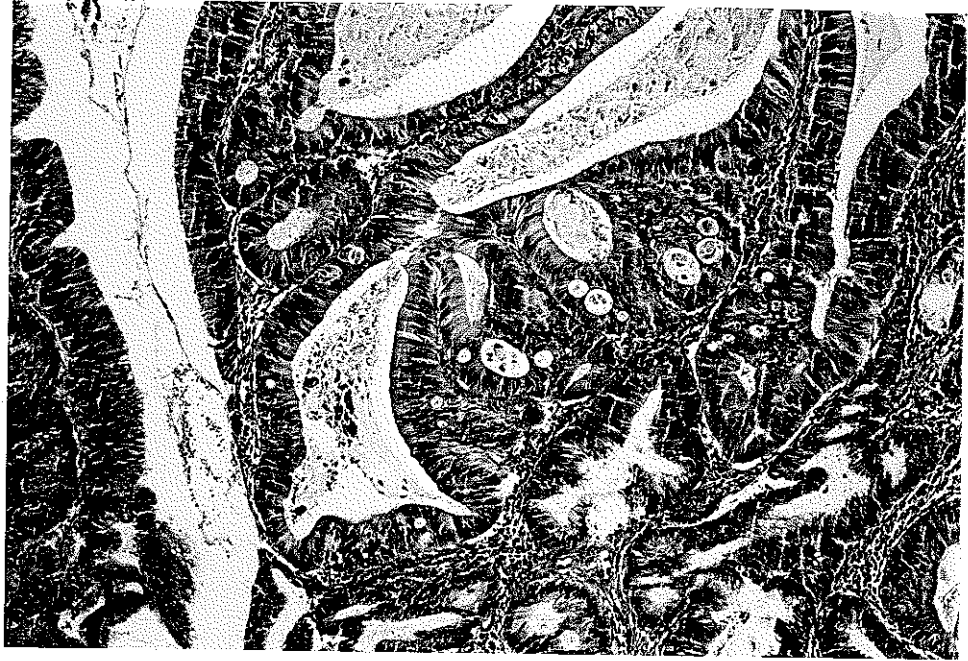
Resim 10 : Tubulovillöz adenom, AgNOR (10 x 100)



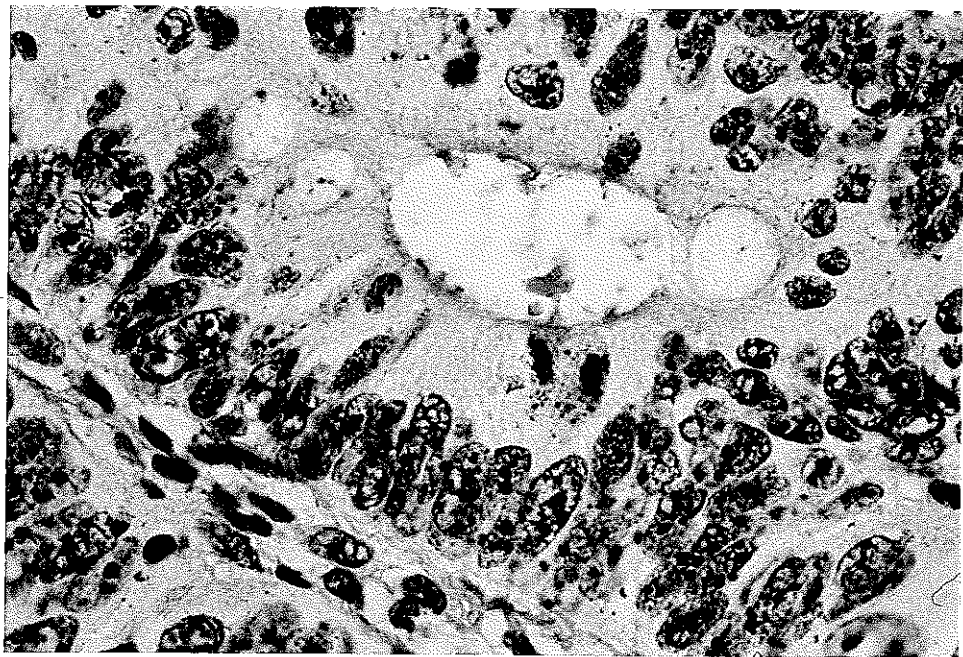
Resim 11 : Peutz Jegher's polipozis, H.E. (10 x 5)



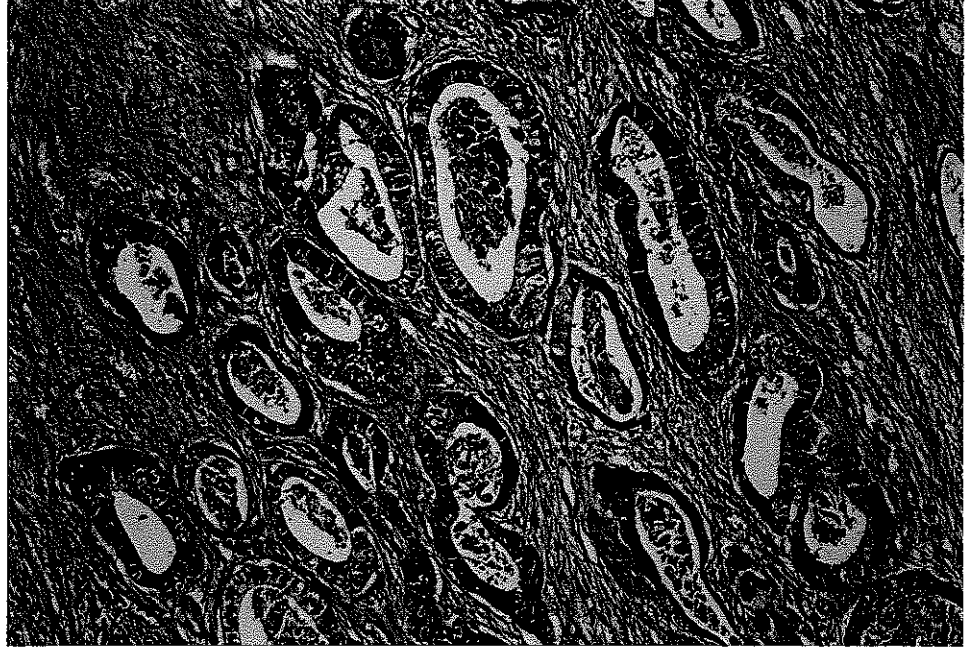
Resim 12 : Peutz Jegher's polipozis, AgNOR (10 x 100)



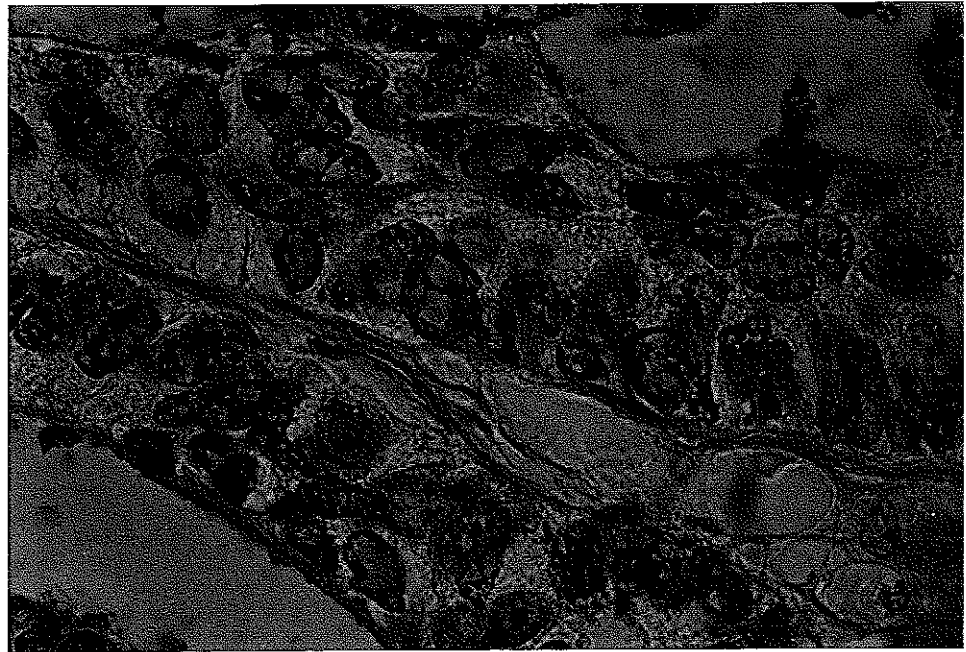
Resim 13 : Adenom + karsinom, H.E. (10 x 10)



Resim 14 : Adenom + karsinom, AgNOR (10 x 100)



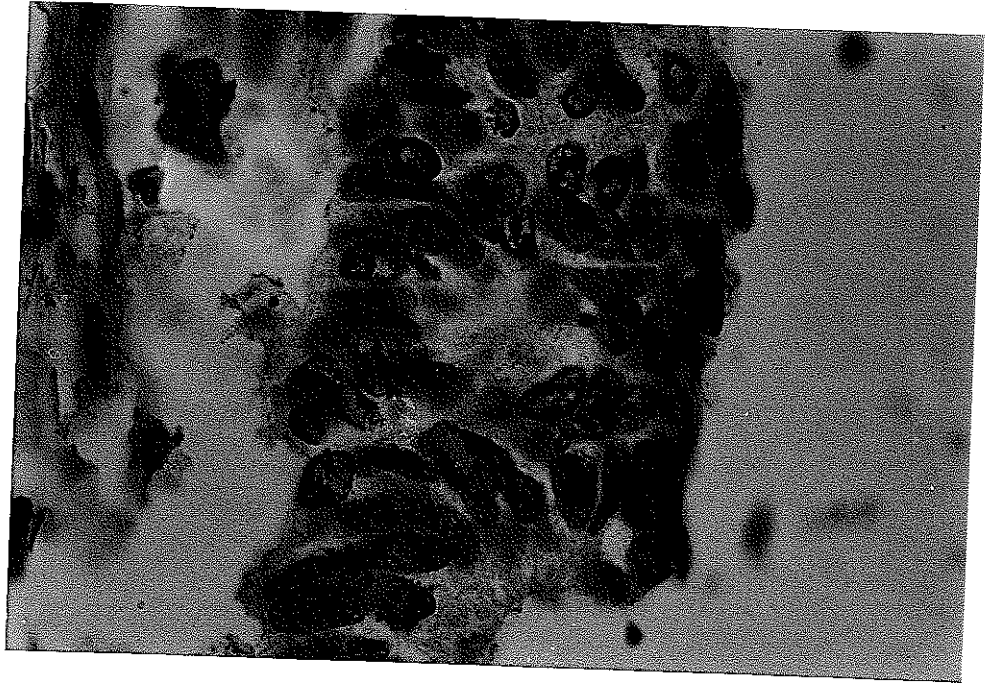
Resim 15 : İyi derecede differansiye adenokarsinom,
H.E. (10 x 10)



Resim 16 : İyi derecede differansiye adenokarsinom,
AgNOR (10 x 100)



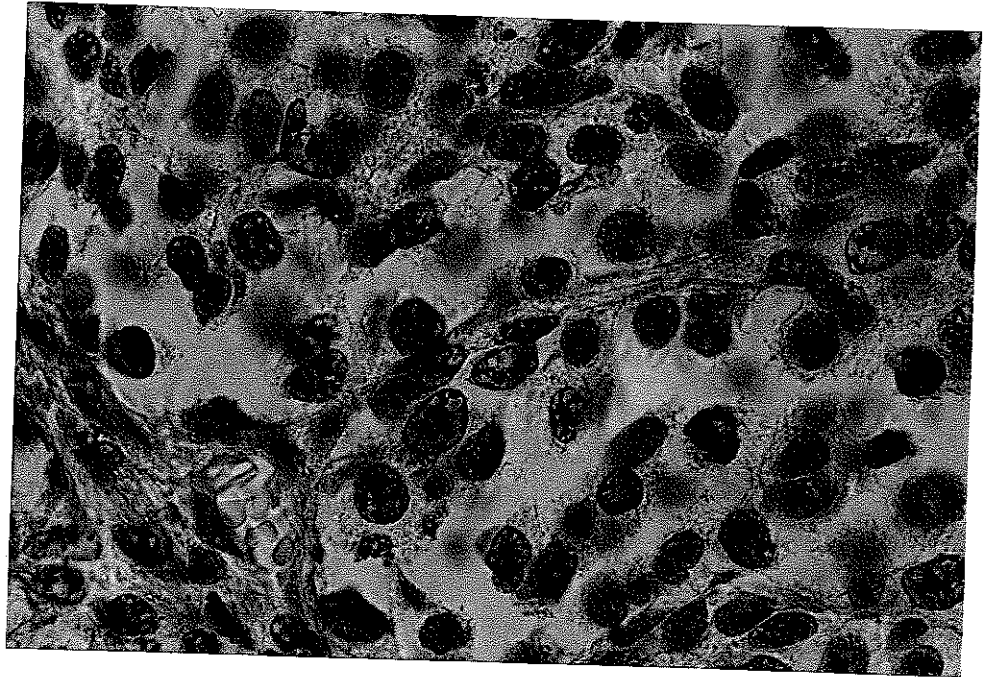
Resim 17 : Orta derecede differansiye adenokarsinom,
H.E. (10 x 10)



Resim 18 : Orta derecede differansiye adenokarsinom,
AgNOR (10 x 100)



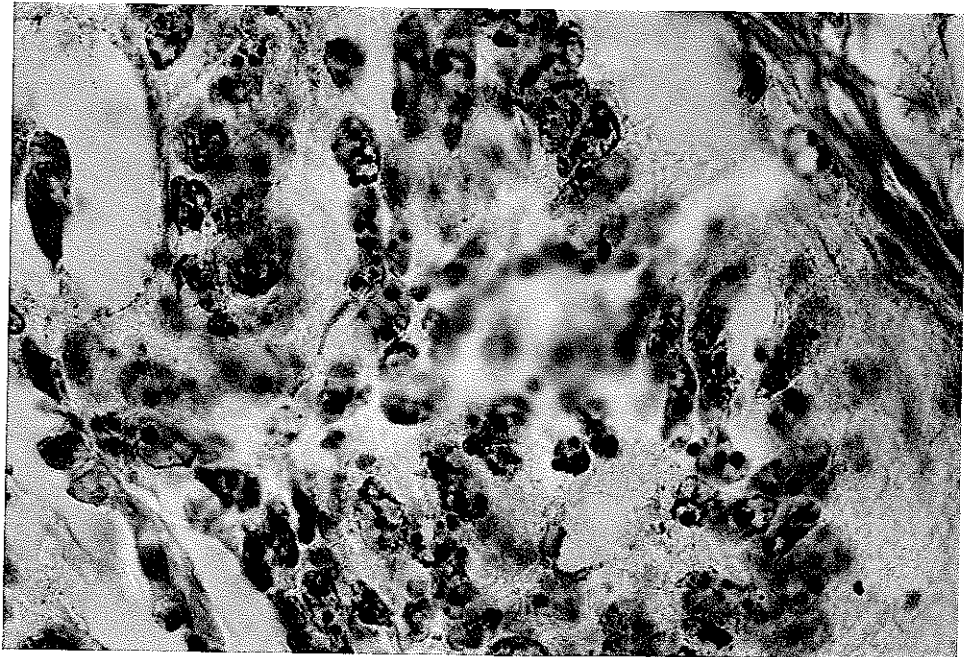
Resim 19 : Kötü derecede differansiye adenokarsinom,
H.E. (10 x 10)



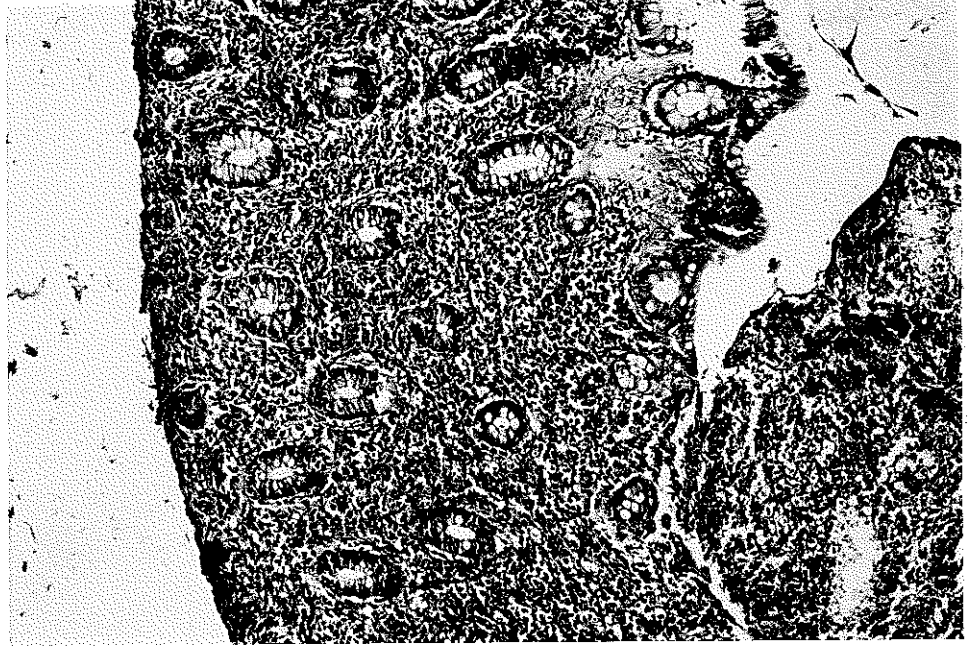
Resim 20 : Kötü derecede differansiye adenokasinom,
AgNOR (10 x 100)



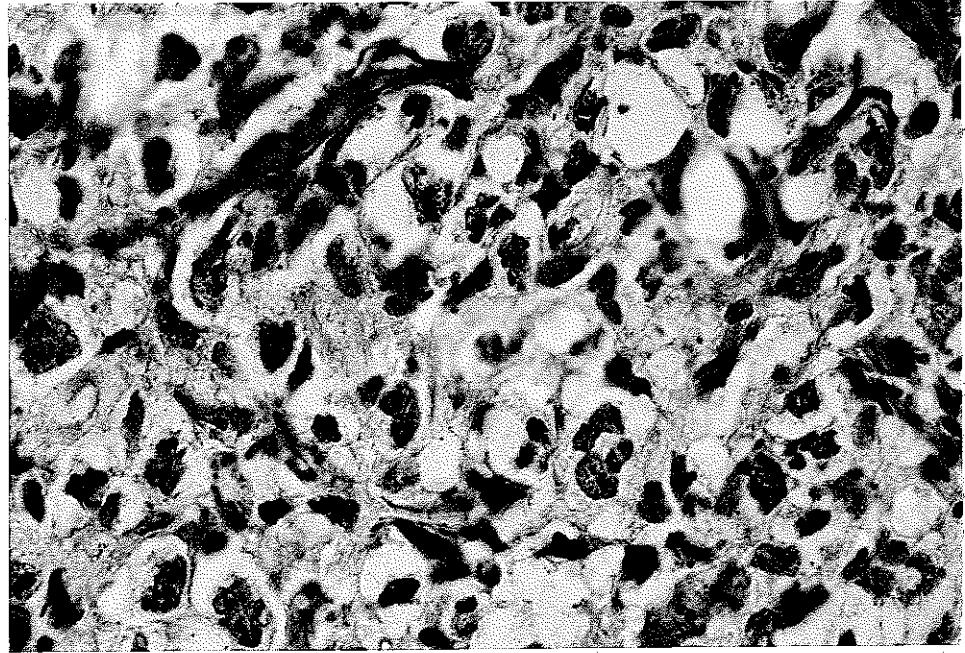
Resim 21 : Müsinöz adenokarsinom, H.E. (10 x 10)



Resim 22 : Müsinöz adenokarsinom, AgNOR (10 x 100)



Resim 23 : İndifferansiye karsinom, H.E. (10 x 10)



Resim 24 : İndifferansiye karsinom, AgNOR (10 x 100)

TARTIŞMA

AgNOR 1970'li yıllardan bu yana Sitogenetikçilerce bir kromozom bantlama tekniği olarak özellikle trizomileri saptamada kullanılmaktaydı (72). Ancak, sonradan AgNOR boyama yönteminin malignitelerde de farklı boyanma örneği gösterdiği ve benign ile malign ayırımında kullanılabileceği düşünülmüştür (1, 18, 50, 57, 89).

Malign hücrelerde nukleolus büyür, nukleoplazma artar ve gümüşle boyanan cisimcikler (bodyler) artar (36, 50).

Önce Howell ve arkadaşlarının, sonrada Crocker ve arkadaşlarının AgNOR boyama metodunu modifiye etmeleriyle bugünkü tek basamaklı kolay uygulanabilir hale gelmiştir (1, 21). Eskiden boyama süresi daha uzun, işlem basamakları daha fazla olması yanı sıra uygulanan daha yüksek ısıya bağlı olarak yoğun şekilde zemin boyanması olmaktadır (72).

NOR'lar nukleolusta iyi sınırlı elektron mikroskopik olarak daha yoğun elektron içeren fibriler senterlerde soluk boyanan alanlar şeklinde izlenirler (1, 5, 30, 39, 44, 52).

NOR'lar rDNA'nın, rRNA'ya kaynaklık eden genlerini bulunduran segmentlerinde (sarmallarında) yer alırlar. (51, 63, 89) Bu genler akrosentrik kromozomlarda (D ve G grubu olarak adlandırılan 13, 14, 15, 21, ve 22. kromozomlar) satellit adı verilen telomerik bölgelerde kümeler halinde yerleşirler (1, 5, 31, 55, 57, 59).

AgNOR boyama yöntemi NOR'ların yapısında bulunan nonhiston proteinlerin afiniteleri nedeniyle gümüş ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopide incelenmeleri esasına dayanır (13, 21, 33, 78).

NOR'ların sabit oluşumlar olmadığı, hücrenin yapısına, organizmadaki değişikliklere, aktiviteye bağlı olarak ve yaşla değişebilecekleri savunulmaktadır (24, 35, 57, 63).

Çok değişik görüşler olsa da bugün için en yaygın olarak kabul edilen NOR'ların hücrenin metabolik ve proliferatif aktivitesiyle ilişkili olduğudur (1, 3, 18, 19, 21, 30, 33, 43, 49, 51, 84, 92). Bu görüşü savunanlar, NOR'ların aktive oluşunu, sayılarının artışı hücrenin protein gereksinimine yani RNA gereksiniminin artmasına bağlamaktadırlar. Buna göre artan gereksinimi karşılayabilmek için rDNA'dan, rRNA yapımı artmakta, bu nükleus zarını geçerek ribozomlarda protein yapımını uyarmaktadır.

NOR'ların tam olarak ne olduklarına dair farklı görüşler vardır. Bu düşünceler 5 grup altında toplanabilir(35). Bunlar sırasıyla ;

- 1- Gen artımı (amplifikasyonu)
- 2- rDNA'nın transkriptif aktivitesinde değişiklik
- 3- Nükleolar ayrışma, birleşme bozukluğu
- 4- Hiperploidi
- 5- Hücresel farklılaşma derecesi olarak ayrılabilir.

1 - *Gen artımı (amplifikasyonu)* ; Bu teoriye göre malign dönüşüm sonrasında somatik mutasyonlar olabilir. Bazı sarkom, karsinom, lösemi, lenfoma türlerinde NOR yer değişiklikleri ve ektopik NOR lokalizasyonları bildirilmiştir(26, 35, 90). Bu görüşü savunanlar değişiklikten sonra daha agresif fenotipe sahip hücre klonları daha indifferan, daha hızlı büyüyen tümör olacaktır, kliniği hızlı gidecektir, demektedirler. Bir çalışmada sıçan hepatoma hücrelerinde, eritrolösemilerde rDNA segmentleri taşıyan ve homojen boyanmış bölgeler

bulunduran kromozomlara sahip hücrelerin diğerlerinden daha agresif olduğu gösterilmiştir (47).

2 - *rDNA'nın transkriptif aktivitesinde değişiklik* ; AgNOR sayısının ve boyanma yoğunluğunun aktif transkripsiyon yapan rDNA'nın sayısına bağlı olarak değiştiği ileri sürülmektedir. Buna göre rRNA aktif olmasıyla gümüş boyanmaktadır. Hücreler arasında rDNA aktivite düzeyinde farklılıklar olabilir (1, 35, 43, 86). rRNA sentezi ile AgNOR sayısı ilişkisinin gösterildiği çalışmalar, blast tipi hücrelerde AgNOR artımını gösteren çalışmalar, büyüme hormonu ile fibroblastların aktivasyonunun gösterildiği çalışmalar vardır (11, 67). Yaş arttıkça lenfositlerde rDNA'ların gittikçe inaktif hale geldiği izlenmiştir (24). Ancak, bunların tersini savunan ve çoğalma hızları farklı iki tümörün rRNA düzeylerinin farklı olmadığını da gösteren çalışmalar vardır (28). Daha da önemlisi rRNA'nın sentezinin olmadığı metafaz süresince ve rRNA sentezinin olmadığı bilinen olgun oosit ve tek hücreli embriyoda bile elektron mikroskopik olarak AgNOR boyanması izlenmiştir (35).

3 - *Nukleolar ayrışma, birleşme bozukluğu* ; Nukleolus organizasyonu hücrenin siklus fazına bağlı olarak değişmektedir. Profazda nukleolusda ayrışma, parçalanma başlar ve mitoz boyunca kromozomal dağılma devam eder, rRNA sentezi durur. Geç telofaz ve erken G₁ döneminde rDNA segmentleri ve yeniden ortaya çıkan NOR segmentleri birleşir, tekrar rRNA sentezi başlar (nukleolar birleşme) (5, 52, 59).

Hızla çoğalan, yüksek grade'li tümörlerde nukleolar birleşmenin henüz tamamlanmadığı erken G₁ ve mitoz fazlarındaki hücreler daha fazlayken normal dokuda veya

düşük grade'li tümörlerde G_1 ve G_0 dönemlerindeki hücreler çoğunluktadır (51). Böylece NOR farklılıklarının hücre siklusuna bağlı olarak değiştiği düşünülebilir. Bu görüşü desteklemek için proliferatif indeks olarak kullanılan ve G_0 fazı dışındaki hücrelerde saptanabilen Ki67 antikoru ile AgNOR'un karşılaştırmalı çalışmaları yapılmış sonuçta her ikisi arasında çok iyi bir korelasyon izlenmiştir (32, 46, 53, 56, 80, 82, 97). Ancak bir ilişkinin saptanamadığını bildiren çalışmalarda vardır (91).

DNA flow sitometrik çalışmalarda da proliferatif indeksi destekleyen çalışmalar ve tam aksine desteklemeyen çalışmalarda vardır (19, 43, 45). Çoğalma hızı farklı iki nöroblastomla yapılan çalışmada tümör hızları ile AgNOR arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (28).

4 - *Hiperploidi* ; rDNA'ların ve AgNOR proteinlerinin akrosentrik kromozomlar üzerinde bulunması nedeni ile AgNOR yönteminin ploidiyi yansıtabileceği düşünülmüştür (46, 83). Bazı flow sitometri ile AgNOR'un birlikte yapıldığı çalışmalarda anlamlı bir ilişki saptanmıştır (71, 95). Ancak buna karşın böyle bir ilişki olmadığını savunanlar daha fazladır (19, 43, 45, 46, 68, 81, 83).

Yapılan bir çalışmada çoğalma hızı farklı iki nöroblastom olgusunun metafazdaki AgNOR değerlerinin farklı olmadığı saptanmıştır. Böylece interfazik AgNOR farklılıklarının metafazik AgNOR değerlerine yansımadağı bildirilmiştir (28). Buna benzer şekilde interfazda görülen AgNOR farklılıklarının metafazdaki AgNOR'lara yansımadağı ve fark görülmediğini, bu nedenle interfazdaki bu farkın sadece AgNOR'la açıklanamayacağını savunanlarda vardır (51, 90). Bir çalışmada interfazik NOR farklılıklarının anormal lokalize NOR'lara bağlı olduğu ileri sürülmüştür (51).

AgNOR artışının sentez fazında (S fazı) rDNA'nın duplikasyonuna bağlı olarak değiştiği ve bunu belirleyici bromohegzöüridin ve AgNOR'la yapılan çalışmalarda iyi bir korelasyon saptanmıştır (76, 91). Bu ilişkiyi saptayamayan ve S fazının hücre siklusunda küçük bir dilim olduğunu, tüm farkın bundan kaynaklanamayacağını da düşünenler vardır(91).

5 - *Hücreyel farklılaşma derecesi* ; Primitif hücrelerden olgun hücrelere gidildikçe AgNOR sayısında azalma izlenmektedir. Bu değişiklik çoğalma hızının azalması sonucu olabilir. Kemik iliğinde ve lenfositlerde bu tip çalışmalar yapılmıştır (24, 73). Fitohemaglutininle blastik değişime uğrayan lenfositlerde başlangıçta artan AgNOR sayısı olgun döneme geçildiğinde azalmıştır (24).

Nöroblastom, ganglionöroblastom, ganglionörom serisinde yapılan bir çalışmada primitif nöroblastik hücrelerden ganglion hücrelerine gidildikçe proliferatif aktivite ve AgNOR gittikçe azalmıştır. Bu da AgNOR'un daha çok proliferasyonla ilişkili olduğunu desteklemiştir (35).

Bu güne kadar AgNOR'la ilgili yapılan çalışmaların çoğu teori düzeyinde kalıp, kesin olarak bir noktaya varılamamıştır. Yalnızca farklı dokularda değil, aynı dokularda çalışan araştırmacılar arasında da farklar vardır. Bunların temelinde genelde AgNOR konusunda standardizasyona gidilememiş olması yatmaktadır. Bazıları AgNOR'u sayısal değil de alansal olarak değerli bulmuşlar ve sayısal olarak daha az sensitif ama alansal olarak daha değerli olan image analiz yöntemi ile AgNOR'u değerlendirmişlerdir (14, 18, 27, 80, 86, 87, 88, 91). Bu araştırmacılar hem parafine gömülmüş dokulara, hem effüzyon ve imprintlerde çalışmışlar bulunan alan değerlerinin daha anlamlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Genelde AgNOR sayısı ve alanı ters ilişki göstermektedir,

bir başka deyişle AgNOR sayıları arttıkça her bir AgNOR noktaciğının kapladığı alan küçülmektedir. Bu bulgu bizim çalışmamızda da benign olgularda daha büyük, gruplar yapan AgNOR noktacıklarına karşın, malign olgularda çok sayıda küçük AgNOR noktaciğının görülmesiyle desteklendi.

Bazıları AgNOR'un prognostik değeri olduğunu savunmuşlardır (13, 49, 53, 54, 56, 61, 68, 77, 86), bir kısmı prognozla ilişkisini saptayamamışlar (45, 98) ve bir kısmı da belli bir sayısal oranın üzerinde prognozla anlamlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (14). Ancak ilginç olarak aynı organda yapılan çalışmalarda örneğin prostatda (13, 14), barsakta (45, 61, 68, 77, 86) yapılan çalışmalarda bir kısmında prognozla AgNOR ilişkisi bulunurken bir kısmında bulunamamıştır.

Memede yapılan çalışmalarda çoğunda Ki67 ile AgNOR birlikte çalışılmış ve sonuçta iyi bir korelasyon olduğu görülmüştür (32, 82, 97). Bir çalışmada meme tümörlerinde lenf nodülü metastazı olanlarda AgNOR daha yüksek bulunmuş, böylece prognozla da ilişkili olarak değerlendirilmiştir(6). Başka çalışmalarda ise, lenf nodu ve tümör boyutu ile ilişkisi saptanamamıştır (71, 82). Memede flow sitometriyle yapılan çalışmaların birinde, tek başına anoploidi ile ilişkisi bulunamamış, ancak belli bir oranın üzeri olarak değerlendirildiğinde anlamlılık ifade etmiş, bir diğerinde ise hem anoploidi ile hem de proliferasyonu gösteren S fazı ile anlamlı sonuçlar vermiştir (43, 71).

Beyin tümörlerindeki çalışmalarda genelde grade'lemede anlamlı bulunmuştur (3, 76, 80, 81, 91). Menengioma'nın subtiplerinde fark izlenmemiş ve NOR sayılarından çok, NOR sahaları anlamlı bulunmuştur (76, 81). Bir çalışmada beyin metastazı olgularının (renal clear sell-hemangioblastom)

ayırıcı tanısında değerli bulunmuştur (17).

Yumuşak doku tümörlerinde grade'le, prognozla anlamlı sonuçlar veren çalışmalar vardır(56, 101). Ki67 ile AgNOR'un birlikte uygulandığı bir çalışmada iyi bir korelasyon izlenirken AgNOR selülarite ile ilişkili fakat mitozla ve pleomorfizmle ilişkisiz sonuçlar vermiştir (56). Diğer bir çalışmada ise mitozla anlamlı bir sonuç verirken, pleomorfizm, differansiyasyon, nekroz alanları, tümör çapı ve selülarite ile AgNOR arasında bir anlamlılık bulunamamıştır (101).

Endometriumda benign ile malign ayrımının anlamlılığına yönelik bir çalışmada basit hiperplazi, proliferatif endometrium ve malignite arasında bir fark bulunamamıştır (15, 99). Yine endometriumda morfometrik bir çalışmada maksimum çap ölçülerek yapılan değerlendirmede AgNOR'un hücre differansiyasyonunu ve rRNA transkripsiyon derecesini gösterdiği düşünülmüştür (79). DNA flow sitometrinin kullanılmadığı bir çalışmada AgNOR ploidiyi yansıtır olarak, bir diğer çalışmada ise proliferatif indeks olarak düşünülmüştür.

Karaciğerde normal yapı, siroz ve karsinom arasında ayırimda anlamlı farklar bulunduran çalışmalar yapılmıştır (20, 96).

Farenks ve larenks tümörlerinin ayırımında başarısız bulunmuştur (8).

Böbrekte adenom ile karsinom ayırımında faydalı olmadığı bulunmuştur (9).

Mesane grade ile anlamlı bulunmuş, ancak her iki çalışmada da 50 hücre değerlendirilmiş ve bunlardan birisinde AgNOR'lar morfolojik görünümüne göre değerlendirilmeye alınmıştır (61, 75).

Testiste intratubuler germ sell neoplazilerinde normal dokudan anlamlı şekilde daha fazla AgNOR noktacığı sayısı görölmüştür (63).

Servikte hem başarılı, hemde başarısız bulan çalışmalar vardır (23, 37, 38). Ancak CIN I'den CIN III'e doğru gidilirken AgNOR sayısında artım yanısıra benign lezyonlardaki AgNOR sayısı ile CIN III arasında anlamlı fark saptanmıştır (37, 38).

Midede yapılan çalışmalarda benign lezyonlardan malign lezyon ayırımında anlamlı bulunmuştur (10, 53, 83). Bir çalışmada Ki67 ile birlikte değerlendirilmeye alınmış ve lenf nodu metastazı olan olgularda iyi bir korelasyon izlenmiştir (53). İntestinal metaplazi olgularında kriptlerin alt ve üst yarıları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (83).

Akciğerde küçük hücreli karsinom dışında kalan stage I tümörlerde INM sınıflamasına göre gruplar arasında AgNOR sayılarında anlamlı fark bulunarak prognozda değerli olduğu görölmüştür (54). Akciğer karsinomlarında tümör tipleri arasında fark saptayamayan çalışmaların yanısıra, tümör tipleri arasında anlamlı olarak fark bulan ve buna dayanarak akciğer karsinomlarını küçük hücreli karsinom ve diğerleri olarak ayıranlarda vardır (54, 74, 93). Pleural çalışmalarda benign mezoteliyal hiperplaziler ile mezoteliyomalar ve adenokarsinomların ayırımında fark bulunamamıştır (94). Bunda belki de mezotel hücrelerinin normalde yüksek proliferasyon potansiyeline sahip hücreler oluşlarının rolü vardır.

Deri tümörlerinde invaziv ve noninvaziv bazal hücreli karsinom ayırımında ve diğer tümörlerle bazal hücreli karsinomun ayırımında anlamlı bulunmuştur (31, 36). Benign

nevüsler ve spitz nevüslerin, malign melanomlarla ayırımlarında faydalı sonuçlar vermiştir (40, 48, 60). Malign melanomda kalınlığı 3 mm'den fazla olan lezyonların prognostik indeks olarak değerlendirilmesinde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (49). Yassı hücreli karsinom ile keratoakantomun ayırımında değerli bulunmuştur (55). Derinin fibrohistiyositik tümörlerinde benign ile sınır ve malign lezyonlar arasında anlamlı fark izlenirken aynı fark sınır ve malign olgular arasında izlenememiştir (66). Tek bir olguluk çalışmada ise malign ektrin poroma, benign ektrin poromadan belirgin oranda yüksek AgNOR sayısı vermiştir (78).

Kemik dokusunda dev hücreli tümör ile anevrizmal kemik kistinin ayırımında faydalı bulunmuştur (33).

Kemik iliğinde yapılan bir çalışmada AgNOR'lar morfolojik olarak değerlendirilmiş blast tipteki hücrelerde daha çok sayıda ve daha büyük AgNOR'lar izlenirken, olgun hücrelerde tam tersi olarak daha az sayıda ve daha küçük AgNOR noktacıkları görülmüştür (73, 90).

Prostat dokusundaki çalışmalarda bazıları benign prostat hiperplazisi ile prostat karsinomu ayırımında fark bulurken, bazıları bu ayırımda faydalı bulamamışlardır (13, 34, 42, 62, 64). Bazen bu fark metastaz olan olgularda daha da belirginleşmiştir (42). İki çalışmada AgNOR tek başına sayısal olarak değil sayı/alan oranı ve nukleolus boyutları ölçülerek çalışılmıştır (14, 34).

Non Hodgkin's lenfomalarda yapılan çalışmalarda düşük grade ile yüksek grade'li tümörler arasında anlamlı fark bulan çalışmalar çoğunluktadır (18,19,21,44,46,98). Çalışılan lenfomaların bir bölümünde DNA flow sitometri, Ki67 ve elektron mikroskopide kullanılmış ve anoplodiyi değil, proliferasyonu yansıttığı sonucuna varılmıştır (19, 44, 46).

Foliküler hiperplazi ile foliküler lenfoma ayırımında anlamlı bulunmamış hatta foliküler hiperplazi olgularında daha yüksek sayıda AgNOR bulunmuştur (22).

İmprint ve effüzyonlarda yapılan çalışmalar parafin kesitlerinden daha iyi sonuç vermiş, daha iyi bir boyama izlenmiş, hücre detayları daha iyi görülmüş ve gerek benign ile malign, gerekse tümörlerin kendi aralarında anlamlı farklar olduğu saptanmıştır (7, 27, 80, 82, 87).

Tümör grade'leri arasında AgNOR'un anlamlı farklı sonuçlar verdiğini bildiren çalışmalar çoğunluktadır (3, 33, 46, 56, 61, 76, 77, 80, 91, 101). Bazılarında grade'ler arasında sınırlı anlam bulunurken (75, 81), bazılarında ise AgNOR'un grade ile ilişkisi saptanamamıştır (74, 82, 86, 94). Bu belkide tümörün köken aldığı organın proliferasyon kabiliyetine bağlı olarak değişmektedir. Şöyle ki köken aldığı doku yavaş gelişen, sınırlı veya yavaş büyüyen hücrelerden oluşan bir doku ise tümör geliştğinde aradaki proliferasyon farkı daha belirgindir. Ancak hızlı proliferasyon olan bir doku ise bundan köken alan tümörle arasında çok belirgin proliferasyon farkı olmayabilir.

Biz AgNOR için barsakta çalışmayı uygun gördük. Çünkü barsakta normal dokunun yanısıra adenom ve adenomdan da karsinoma geçişi saptayabilirdik. Böylece gittikçe proliferasyon indeksi olarak kullanılmaya başlanan AgNOR'u hem barsakta çalışmış olacak hem de bu prekanseröz kabul edilen olguların bu yönden doğruluğunu araştıracaktık (12, 25, 41, 58, 69, 70, 85, 100).

Olguları 1982-1992 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında değerlendirilmiş 103 olgudan alınan 130 preparatda inceledik. Ancak istatistiki çalışmaya 100 olgu ve 125

preparatı aldık, bunun nedeni az sayıda bulunan Peutz Jegher's polipozis ve indifferansiye karsinomların istatistiki anlamı olmayacağıdır.

Tüm olguları % 10 formalinle tespitlenmiş ve rutin takipten sonra parafine gömülmüş dokulardan aldık. % 10 formalin AgNOR boyanmasında uygun boyanma sağlamaktadır. En iyi boyanmayı ise alkollü fiksatifler, özellikle Carnoy solüsyonu ve % 10 tamponlu nötral formalin vermektedir. Cıvalı fiksatifler (Zenker, Helly, formol sublime) ve dikromat içeren fiksatifler ise boyanmayı azaltmaktadırlar. Bouin's solüsyonu da uygun boyanma vermektedir (29, 88, 92). Fiksatiflerin boyanmayı arttırıp, azaltması AgNOR proteinlerinin yapısındaki sülfidril ve disülfid gruplarından ileri gelmektedir (92). Uzun formalin fiksasyonunun küçük noktacıkların birleşmesine neden olduğunu ve bu nedenle yanlış sonuçlar verebileceğini söyleyenler (45), yanısıra uzun fiksasyonun AgNOR'u etkilemeyeceğini savunanlarda vardır (65).

AgNOR boyası NOR'ların yapısındaki histon ve nonhiston proteinlerden nonhiston proteinlere spesifik reaksiyon vermektedir (3, 33, 78, 89, 92). Nonhiston proteinlerin karboksil gruplarını gümüş solüsyonundaki gümüşün mikronüklei şekillenmesini, yani gümüşün çok küçük noktalar halinde oluşumunu azaltarak bunların sülfidril ve disülfidlerde (sistin ve sisteinin) depolanmasını sağladıkları düşünülmektedir. Bu sayede ışık mikroskobunda görülebilen depolanmalar meydana gelmektedir (92). Bizim çalışmamızda özellikle eski preparatlarda bazen formalin pigmenti çöküntülerinin sayımı engellemesi ile bazı preparatların çalışmaya alınmamasına yol açtı.

Olgularımızın yaşları, dağılımları, görülme sıklıkları ve lokalizasyonları genelde literatüre uygunluk göstermekte idi (12,25,41,58,69,85,100). Adenomlardan en sık adenomatöz polip, sonra tubulovillöz adenom vardı. Tümörlerden en sık iyi ve orta derecede differansiye adenokarsinoma rastlandı. Olguların çoğu rektosigmoid bölgeye lokalize idi. Sadece prekanseröz kabul edilen polipleri almamış olmak için bu riski taşımadıkları kabul edilen juvenil ve hiperplastik polipleri de çalışmamıza aldık.

Olguların tamamında elimizde yeterli bilgi ve materyal olmadığından tümüyle prognostik bir çalışmaya yönelemedik. Ancak elimizdeki mevcut bulgulara göre prognozla istatistiki anlam saptayamadık. Bizim gibi barsakta çalışmada prognozla AgNOR'un ilişkisiz olduğunu (45) ve tam tersine çok anlamlı, hatta plooididen daha anlamlı bulan çalışmalarda vardır (68, 77, 86).

Barsakta çalışmada lenf nodülü metastazlarındaki tümör dokusu ile mevcut tümörden farklı sonuçlar alınamayan çalışmalar bulunduğundan bizde çalışmamıza metastaz bulunan lenf nodüllerini almadık (68, 86). Tümörün makroskopik tipinin daha önceki çalışmalarda önemli olmaması üzerine bizde bunu dikkate almadık (86). Daha önceki çalışmalardaki gibi nekrozlu dokularda özellikle yanılığa yol açmamak için ya varsa diğer alanlarda değerlendirme yaptık, ya da bu preparatları çalışma dışı tuttuk (29, 88, 92).

Kesitlerimizi 3µ olarak alkolle temizlenmiş lamalar üzerine, bidistile su doldurulmuş su banyolarından aldık. Literatürde genelde 3-4µ olmak üzere 2-6µ arasında alınan kesitlerde çalışılmıştır. Hatta bir çalışmada beyin tümörlerinde 10µ kalınlığında kesitler alınıp, incelenmiştir (91). Çok ince kesitlerde hücrenin bir bölümünün kesit

alınırken atılabileceği, çok kalın kesitlerde ise AgNOR noktacıklarının sayımında güçlkle karşılaşılabacağı söylenmektedir (16, 88). Bazen kesitlerini krom jelle kaplı lamalara alan çalışmalarda vardır (77).

Boyama tekniği olarak, diğer tüm literatürlerdeki gibi Crocker'in modifiye boyama yöntemini uyguladık (21).

Bazen gelatin iyi erimediğinde bir gün öncesinde etüve bırakıp, iyice erimesini sağladıktan sonra filtrelilikerek soğutup kullandık.

Boyama tekniğinde literatürlerde bir fark görülmezken, boyama sürelerinde oldukça farklı süreler vardı. Bu süreler 20 ile 60 dakika arasında değişmekte idi. Barsak dışındaki dokularda genelde 30 ile 45 dakika optimal süre olarak uygulanıyordu. Biz çalışmamıza başlamadan önce 20 dakikadan başlayarak giderek artan sürelerle 60 dakikaya kadar AgNOR boyamasını denedik. Sonuçta 27-28. dakikaları barsak için en uygun süre olarak saptadık. Bu süre değişik dokularda optimal boyanmaları saptamak üzere gerçekleştirilen bir çalışmada barsak için bulunan ve barsakta yapılan bir diğer çalışmada da bulunan süre idi (86, 87).

Boyama işleminden sonra kesitleri bolca bidistile su ile yıkadıktan sonra AgNOR boyasını kalıcı kılmak için % 5'lik sodyum tiyosülfatta 4-5 dakika kesitleri beklettik, bunu uygulayan başka araştırmacılar da vardı (10, 32, 96). Sonra tekrar bolca bidistile su ile yıkayıp kapama işlemine kadar normal doku takiplerini yaptık. Bir çalışmada gümüş boyasının kalıcılığını arttırmak için altın klorid solüsyonu kullanılmış ve eğer fazla boyanma sözkonusu ise gümüş boyanmasını azaltmak için potasyum ferrisiyanid ile işleme alınmasını önermişlerdir (10).

Çalışmalarımız öncesinde Mayer hematoksilen, nötral red, metil green pyronin ile zıt boyamalar yaptık. Bu zıt boyamaların bize daha fazla bir fayda getirmediği kanısına vararak, zıt boya ve immunohistokimya uygulamadık. Ancak, az sayıda da olsa zıt boya uygulayanlar vardır (38, 62, 96).

Boyaların internal kontrolünde tüm literatürlerdeki gibi stromal hücrelerdeki ve lenfositlerdeki bir AgNOR noktacığı boyanmasını esas aldık.

Literatürde doku takibini normal, alışılmış fiksatiflerle değil de kriyostatla önce dondurup, sonra takip edenler yanısıra, mikrodalga ile doku takibini yapanlara da rastlanılmaktadır (60, 62, 82).

Bazı araştırmacılar sayılması gereken hücrelerin diğer hücrelerle örneğin damar endoteli, stromal hücrelerle karışmaması için immunohistokimya ile AgNOR'u aynı preparata uygulamışlardır. Bu kombine boyama tekniğinin AgNOR'un sonucunu etkilemediği ve hücre differansiyasyonunu sağladığından karışıklığa yol açmaması nedeniyle tercih edilmesini ileri sürmektedirler (13, 17, 65, 72, 81, 94). Yine bu çalışmalardan birinde AgNOR'dan önce ve sonra immunohistokimyanın denenmesi sonucunda immun boyamanın AgNOR'dan daha önce yapılmasının faydayı arttıracacağı görüşü ileri sürülmektedir (65).

Gerek gümüşdeki gerekse gelatindeki artefaktları azaltmak için çoğu araştırmacının yaptığı gibi solüsyonları bizde filtreledik. Bir araştırmada hipotonik ortam yaratılarak nukleusun şişmesi sağlandığında noktacıkların daha iyi ayırt edilebileceği savunulmaktadır (64).

Sayma yöntemini, tüm literatürlerdeki gibi kliniğini, tanısını önceden bilmeyen iki patolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirerek uyguladık. İki gözlemci

arasındaki fark % 10'dan azdı. Değerlendirmeyi 1000 büyütme altında immersiyon objektifinde yaptık. Biz değerlendirmeyi yaparken toplam 100 hücrede intra ve ekstranukleolar ayırt edilebilen her noktacığı büyüklüğü ne olursa olsun, 1 olarak değerlendirmeye aldık. Ancak literatürde az sayıda da olsa 50 hücre (34, 68, 75), 200-300 hücre (21, 40, 43, 91) ve hatta 500 hücreye (93) kadar sayım yapıp değerlendiren araştırmacılar da vardır. Sayım sırasında herhangi bir filtre kullanmadık, ama kullananlara da rastlanılmaktadır (16).

Bazıları nukleolus içindeki noktacıkları ayırt etmeden tümünü 1 olarak sayıp, diğer sayımlarla karşılaştırıp değerlendirme aşamasında bir fark olmadığını ifade etmektedirler (16, 43, 45, 49, 71, 95, 96). Ancak biz çalışmalarımız sırasında bu değerlendirmenin hatalı olabileceğini düşündük. Çünkü normal cerrahi sınırda ve juvenil veya hiperplastik polipte normalde az sayıda bulunan nukleoluslarda 1-2 veya nadiren 3 tane noktacı izlerken bir adenomda tek bir nukleolus içinde bazen 6-7 tane AgNOR noktacığı gördüğümüzde oldu.

Bazı araştırmacılar AgNOR'un boyutlarına, çaplarına göre kendilerince skorlar verip, puanlayıp ona göre değerlendirme yapmışlardır (68, 73). Bazıları ise AgNOR'u sayısal olarak değil, morfolojik olarak regüler, irregüler, tiplerine göre gruplara ayırarak ve bunlara göre değerlendirme yapmışlardır (16, 73, 75, 101).

Bize göre bu şekil farklılıkları normal doku ile malign dokunun boyanma farkından ileri gelmektedir. Ancak bu şekle göre değerlendirme daha subjektif olduğundan, yanılılı veya kişiden kişiye değişebilen, yorum farklılıkları olabileceği ve tümör heterojenitesinin de farklı sonuçlara götürebileceği bir gerçektir. Bizce esas olan uygun boya ve

uygun sürelerdeki intra ve ekstranukleolar ayırt edilebilen her noktacığın değerlendirilmeye alınmasıdır.

Bir kısım araştırmacı AgNOR'un değerlendirilmesinde esas olanın noktacıkların sayısal değerlerinin değilde, kapladıkları alan olduğunu savunmaktadırlar (81). Bunu savunanlar hem sayma yöntemi karışıklıklarını ortadan kaldırmak için, hem de insan gözünün yanılgılarını en aza indirebilmek için bunu gerekli görmektedirler. Bu nedenle bir kısmı AgNOR'u değerlendirmede elektron mikroskopi kullanmakta ve alan ölçümü yapmaktadırlar (30, 44). Bir başka grup ise iki noktayı ayırmada daha az sensitif fakat, total alanları hesaplamada daha faydalı olan image analiz yöntemi ile alan hesaplanmasına gitmektedirler. Bunlardan çıkan sonuca göre normalden malignensiye gidildikçe AgNOR noktacıkları sayılarının artmasına karşın, noktacıkların her birinin kapladığı alanın azaldığıdır (14, 18, 27, 80, 86, 87, 88, 91).

Birkaç çalışmada küçük sayılarda benign ile malign ayırımı yapılamasada belli bir sayının üzerindeki sonuçlarda kesin ayırımın yapılabileceği sonucuna varılmıştır (43, 76, 77, 86).

Boyama süresi konusunda da ortak bir fikir henüz oluşmamıştır. Genelde 20 ile 60 dakika arasında çalışılırsa bazen 70 dakikaya kadar uzayan çalışmalar vardır (94). Ancak uzun süreli boyamalarda noktacıklar gittikçe fazla global yapılar haline dönüştüğünden, sayısal farklar azalmakta ve total değerler tüm gruplarda düşerek gerçek anlamlarını yitirmektedirler.

Az sayıda çalışmada önerilen 20-25°C'nin çok üzerinde 37°C'de çalışanlarda vardır (27, 99). Biz çalışma dönemimizin yaz aylarına rastlaması ile bazen 28-30°C'ye

varan sıcaklıkta çalışmak zorunda kaldık. Bu da zemin boyanmasını arttırarak kötü boyanmaya ve tüm bu preparatların değerlendirilmeye alınmamasına yol açtı.

Biz çalışmamızda belli bir standardizasyona gidebilmek için genelde bezlerdeki hücrelerin boyuna kesitlerinde ve o grup olgular için en spesifik alanları değerlendirmeye almaya çalıştık. Nekrozlu, yoğun yangı bulunduran, kanamalı, doku bütünlüğünün bozulduğu, formalin artefaktı ve AgNOR boya artefaktlarını bulunduran alanlardan kaçındık.

Tüm bunlara karşın aynı olguda yan yana iki hücrede veya aynı olgunun farklı preparatlarında farklı sonuçlar alabiliyorduk. Bunda hücre siklusunun ve hücrenin o anki metabolik aktivitesinin rolü olduğunu düşünüyoruz. Bu nedenle de özellikle nukleolus içindeki noktacıklarında ayrıca sayımı gerektiğini düşünüyoruz, çünkü bu hücrenin metabolik aktivitesinin göstergesidir.

Çalışmamıza müsinöz adenokarsinomları da aldık, ancak diğer barsakta çalışan araştırmacılar müsinöz adenokarsinomları çalışmalarına almamışlardı. Gerçekten de sonuçta bu tip tümörlerin çoğunda differansiasyonuna bakılmaksızın kötü boyanma elde ettik. Aynı zamanda istatistikî değerlendirilmede de iyi derecede differansiye adenokarsinomlar ile müsinöz adenokarsinomlar çakışarak anlamsızlık ifadesi verdiler. Bu nedenle belki de müsinöz adenokarsinomlar için daha farklı bir sürede AgNOR boyanması gerekmektedir.

Bazı olgulardan çalışmamıza birkaç preparat aldık, bunda her preparatta farklı sonuçlar elde edebildiğimizden bir sakınca görmedik.

Biopsilerde genelde literatürde de desteklenir nitelikte daha iyi boyanma izledik (88).

Hiperplastik ve juvenil poliplerde normal cerrahi sınırlardan daha az sayıda AgNOR noktacığı elde ettik. Bunda çalışılan tüm barsak dokularının tümör gelişmiş barsaklara ait olmasının, yani normale göre daha aktif olan dokularda çalışmamızın rolü olabileceğini düşündük.

Tümör olmayan dokularda daha önce displazi tanısı almış olgularda, almayanlara göre rölatif olarak yüksek AgNOR sayısı izledik. Aynı durum adenomun komşuluğundaki tümör olgularında diğer karsinomla ilişkisiz adenomlardan daha yüksek AgNOR izlenmesinde de sözkonusuydu. Ancak her iki durumda da istatistiki bir anlamlılık saptanamadı.

Bezlerin veya kriptlerin yüzeysel kısımlarında daha az, derin yani proliferasyonun gerçekleştiği kısımlarda daha yüksek sonuçlar aldık, buna benzer sonuçlar belirten araştırmalar vardı (86). Yine tubulovillöz adenomlarda papiller yapıda rölatif bir sayı artımı izleniyordu.

Az differansiye adenokarsinomlar düşük değerler verdiler. Bu belki de zaten proliferasyon ve metabolik aktivitesi çok yüksek olan barsağın daha az differansiye oluşuna, daha kötü taklit edilmesine bağlıdır. Böylece AgNOR'un proliferasyonu ve metabolik aktiviteyi yansıttığı bize göre daha da ağırlık kazanmaktadır.

Diğer barsakta çalışanlara benzer şekilde, bizde AgNOR ile lokalizasyon, yaş ve seks ile ilişki saptayamadık (68, 77, 86).

İzlediğimiz boyanma özellikleri de diğer tüm literatürlerdekine benzer özellikleri yansıtmaktaydı. Cerrahi sınır, juvenil ve hiperplastik polipler, yani tümüyle benign grup olarak aldığımız olgularda 1 veya 2 regüler görünümlü nukleolusta az sayıda küçük çaplı, yuvarlak, düzgün görünümlü AgNOR noktacıkları vardı.

Sınır veya malignite potansiyeline sahip ve artmış metabolik aktivite bulunduran adenom gruplarında nukleuslar ve nukleoluslar büyümüş olarak görülüyorlardı. Nukleolus zarları belirgin, nukleoluslar sayıca artmış, pleomorfik görünümde ve içlerinde çok sayıda yine pleomorfik görünümlü genelde büyük ama farklı çaplarda AgNOR noktacıkları vardı.

Tümör + adenom olgularında tümöre komşu adenomlarda nukleus zarları daha belirgin ve nukleoluslar daha pleomorfikti. AgNOR'ların çapları ise gittikçe küçülmekte ve sayıları artmaktaydı.

Tümörlerde ise çok sayıda ve özellikle nukleolus dışında daha belirgin olarak artmış, küçük çaplarda AgNOR noktacıkları izleniyordu. Bazen bunlar kum yığını gibi tarif edebileceğimiz ölçüde yoğun ve dağınık özellikteydiler. Bir çalışmada nukleolus içindikilerin değil nukleolus dışındaki AgNOR'ların değerlendirilmesinin daha doğru olacağı savunulmuştur (77).

Hem AgNOR yapılarının farklılaşması, hem de istatistiki çalışmaların doğrultusunda biz yaptığımız bu çalışmanın sonucunda karsinom gelişiminde adenomların birer risk unsurları oldukları sonucuna vardık.

Diğer barsakta yapılmış çalışmalarla sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda aynı süreyi kullanan 2 çalışmada değerlendirmelerini image analizle yaptıklarından sayısal olarak bir karşılaştırma yapamadık (86, 88). Diğer çalışmaların biri dışında tümünde bizden daha düşük sayıda AgNOR sonuçları elde edilmiştir (30, 77, 102). Bunların birinde bizden daha kısa sürede boyama uygulanmış ve daha az sayıda hücre değerlendirmeye alınmıştır (30). Ancak diğer iki çalışmada daha uzun sürede boyama yapılmış ve daha az sayıda AgNOR boyanan noktacık sayısı elde edilmiştir (77, 102).

Bize göre bu çalışmalarda daha kısa süre (ki bu süre 14 dakika idi) AgNOR'un tümünün boyanması için yeterli olmayan bir süredir ve bu nedenle düşük sayılar bulunmuştur. Diğer iki çalışmadaki uzun sürelerde ise, sürenin artımıyla AgNOR noktacıklarının birleşip gruplar yapmaya eğilimi olduğundan ince detayları incelenememektedir. Böylece daha az sayıda, daha büyük yapılar halinde AgNOR noktacıkları izlenmekte olduğundan total sayıların azaldığını düşünüyoruz.

Diğer tüm barsakta çalışanlar bizim gibi AgNOR'u barsakta benignden, adenoma ve tümöre geçişte anlamlı olduğunu belirten farklar bulmuşlardır (30, 45, 68, 77, 86, 88, 102).

Barsakta prognoz saptamada faydalı bulmayanlar (45) yanısıra prognoz saptamada önemli olduğunu, hatta içlerinden birinde ploiddiden daha anlamlı olduğunu bulan çalışmalar vardır (68, 77, 86). Ancak prognozla ilişki bulamayan çalışmada nukleolusun içindekileri ayırmaksızın tümüyle 1 olarak değerlendiren farklı bir sayma yöntemi uygulamışlardır. Bize göre bu sayma şekli yanlıştır ve aradaki fark buradan kaynaklanmaktadır. Her ne kadar biz elimizdeki verilerle prognozla ilişkisini saptayamadıysak da bu bizdeki verilerin yetersizliğinden kaynaklanmış olabilir ve tümüyle prognozla ilişkisiz olarak değerlendirmek sakıncalı olacaktır.

Biz AgNOR'un proliferatif ve metabolik aktiviteyi yansıttığını düşünüyoruz. Buna göre proliferatif aktivitesi yüksek hücrelerde G_0 fazındaki hücre oranı azalır. Hücrelerin çoğunluğu nukleolus organizasyonunun başladığı ve henüz tamamlanmadığı G_1 fazında bulunur. Mitozu çok yani proliferatif aktivitesi yüksek hücrelerde nukleolar ayrışmaya bağlı olarak NOR'lar ayrı ayrı dağınık ve çok

sayıda izlenir. Böylece AgNOR sayıları daha fazla sayıda görülür, buraya kadarki aşama malign tümörler için geçerlidir.

Proliferatif aktivitesi düşük hücrelerde ise G_0 fazındaki hücre oranı artar. NOR'lar nukleoluslar içinde bir arada, küçük gruplar yapacak şekilde yapılanmışlardır. Bu normal veya benign olgular için geçerlidir.

Metabolik aktivite arttıkça hücrenin rRNA'ya ihtiyacı doğal olarak artmaktadır, dolayısıyla rDNA'nın artması gerekmektedir. Böylece NOR'ların sayısı artar, ancak bu olay proliferatif etki olmadığından nukleolusta sınırlı kalır ve nukleoluslar büyür, genişler. Bu aşama adenomlar için geçerlidir.

Hem proliferatif, hem de metabolik aktivitenin artmış olduğu olgularda bizim adenom + karsinom olgularındaki gibi hem intra, hem de ekstra nukleoler AgNOR artışı olacaktır.

Hem proliferatif aktivitesi, hem de metabolik aktivitesi son derece zayıf hücrelerde ise çok az sayıda 1-2 adet NOR izlenebilir, bunlara en tipik örnek internal kontrol olarak kullanılan lenfositleri örnek verebiliriz.

Bunlardan sonra AgNOR'un değerlendirilmesinde belki de sayısal değil alansal ve noktacıkların görüldüğü, yer aldığı nukleus içindeki bölgeler önemli olabilir. Yani AgNOR'lar benign bir olguda nukleolusta izlenirken, malign bir olguda nukleolus dışında da izlenebilmektedir. Biz benign olmasına rağmen nukleolusta sınırlı kalıp malign olgular kadar yüksek AgNOR sayısı gösterebilen azımsanmayacak oranda çok benign özellikte hücreler saptadık.

Her zaman için AgNOR'un malign-benign ayrımında kesin bir kriter olarak alınamayacağına ve bunun bugün için geldiğimiz noktada özellikle tek bir olguda tanı verdirici

nitelikte kullanılmasının problemler yaratacağını düşünürüz. AgNOR bizim çalışmamızda tek tek olgular arasında değilde, ancak gruplar arasında anlamlılık ifade etti. Çünkü çok yoğun olarak gruplardaki olgular arasında yoğun sayısal çakışmalar vardı.

Herşeyden önce, bu konuda belli bir standardizasyona gidilmesi gerekmektedir. Çok değişik görüş ve uygulamalar varken, bu yöntemin bugünkü şekliyle tanı koydurucu olarak kullanılması birçok farklılıklar doğurabilir.

Bizim edindiğimiz izlenime göre her dokunun ve belkide her preparatın farklı sürede ve boyanabilirliği değişebilir. Bunu araştırmacı, hem kendi deneyimleri ile, hem de boyanın internal kontrolüyle sınımalıdır.

SONUÇ

Bugün için patolojide hemen her alanda benign ile malign ayrımında güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Sadece rutin hematoksilen eozin boyamanın yeterli olmadığı durumlarda yardımcı tümör markerlerine gereksinim olabilmektedir.

AgNOR son yıllarda rağbet gören ve hemen hergün için daha çok sayıda araştırmaya konu olan bir tür gümüş boyası yöntemidir.

Ancak bugün için temelde AgNOR'un işlevini nasıl yaptığı, neyi yansıttığı halen tartışmalıdır. Bu konuda kesin bir standardizasyona gidilememiş, boyama metodu dışında, boyama süresi, değerlendirme yöntemleri ve sayma yöntemleri arasında tüm uygulayıcılar tarafından ortak bir sistem oluşturulamamıştır.

Biz AgNOR'un hem nukleolus içi, hem de nukleolus dışında görülebilen tüm noktacıkların sayılması gerektiğini, her dokunun boyanma süresinin o dokuya özgü olacağını ve bunu internal kontrolde lenfositlerde 1 boyanma noktacığının esas alınması şeklinde uygulanmasının doğru olacağını düşünüyoruz.

Bize göre AgNOR hücredeki hem metabolik, hem de proliferatif aktiviteyi yansıtmaktadır. Benign olgularda malign olgular kadar yüksek AgNOR bulunabileceğini, fakat bunun lokalizasyonunun önemli olduğunu düşünüyoruz. Malign olgularda nukleolus dışında da AgNOR noktacıkları izlenirken benign olgularda bu izlem sözkonusu değildir.

Yapmış olduğumuz çalışmada AgNOR'u barsakta başarılı bulduk. Benign, sınır ve malign olgular arasında istatistiki anlamlılık veren sonuçlar elde ettik. Adenomların kolon karsinomları gelişiminde rolleri olduğunu destekleyen bulgular saptadık.

Ancak, bugün için AgNOR'un tek başına ve tek bir olguda tanı koydurucu olarak değerlendirilmemesi gerektiğini düşünüyoruz. AgNOR tek tek hücre düzeyinde büyük çakışmalara yol açmakta, ancak çok sayıda olgunun bir araya gelerek oluşturduğu gruplar arasında bir anlamlılık ifade etmektedir.

Son olarak, AgNOR boyama yönteminde araştırmacılar arasında ortak bir standardizasyona gidilmesi ve bu doğrultuda olguların değerlendirilmesi gerekir. Böylece bu yöntem, ileride bir tümör belirteci olarak, benign - malign ayrımında, grade'leme ve stage'lemede kullanılabilir.

ÖZET

1982-1992 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına gelmiş, histopatolojik değerlendirilmesi yapılmış, kolon polip ve malign tümörlerinde AgNOR boyama yöntemini uyguladık.

AgNOR boyama yöntemi uzun yıllar sitogenetikçilerce kromozom bantlama yöntemi olarak, özellikle trizomileri saptamada kullanılmagelmiştir. Ancak sonradan 1975'lerden sonra patologlar tarafından bir tümör belirteci olarak çok farklı dokularda malign ve benign ayrımında kullanılmaya başlanmıştır.

NOR'lar rDNA'nın rRNA'ya kaynaklık eden genlerini bulunduran akrosentrik kromozomlardaki (D ve G grubu kromozomları olup, 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlardır) sarmallardır ve mitozdan sonra nukleolusun yeniden yapılanmasında rol oynarlar (Nucleolus Organizer Regions). Hücrede protein sentezi için gerekli rRNA'nın üretimini gerçekleştirirler. Basit olarak hücrede protein gereksinimi artmışsa rDNA'dan rRNA yapımı, yani NOR'lar artış gösterir.

AgNOR boyama yöntemi NOR'ların yapısında bulunan nonhiston proteinlerin gümüşe karşı gösterdikleri afiniteleri nedeniyle, gümüşle boyanarak ışık ve elektron mikroskopide incelenebilme esasına dayanır.

Bugün için en çok kabul edilen ve bizimde savunduğumuz NOR'ların hücrenin proliferatif ve metabolik aktivitesini yansıttığı görüşüdür.

Biz çalışmamızda hem elimizde yeterli materyal olduğundan, hem de benignden maligniteye geçiş gösterebilen, prekanseröz kabul edilen lezyonları bulunduran bir doku olduğundan AgNOR boyama tekniğini barsakta gerçekleştirdik. Böylece prekanseröz olarak kabul edilen lezyonların doğruluğunu da sınamış olduk.

Tüm olguları cerrahi sınır, adenomlar, adenom + karsinomlar ve karsinomlarında differansiasyolarına göre kendi içlerinde ayırarak gruplandırıp istatistiki değerlendirmeye aldık.

Benignden prekanseröz lezyonlara ve maligniteye doğru giderken, AgNOR şekil ve dağılım farklılıkları yanısıra, AgNOR sayılarında istatistiki anlam ifade eden sayısal artım vardı. Tüm gruplar arasında sadece iyi derecede differansiye adenokarsinom ile, müsinöz adenokarsinomlar arasında istatistiki anlamlılık yoktu. Gruplar arasında farklılık varken, tek tek olgular arasında yoğun çakışmalar, hatta bazen benign ile malignin beklenenin tam tersi sonuçları veren preparatlara da rastladık.

AgNOR ile yaş, seks, tümör lokalizasyonu arasında bir ilişki saptayamadık. Literatürde özellikle barsakta prognozla yoğun ilişkili ve anlamlı yayınlar varken, bizim elimizde böyle bir çalışmaya gidecek yeterli klinik bilgi yoktu.

Bu çalışmada adenomların karsinomlara geçiş gösterebilecek prekanseröz lezyonlar olduğunu destekler bulgular elde ettik.

Bize göre bu aşamada AgNOR tek bir olgu için tanı koydurucu olmamalıdır. Bu konuda kesin bir standardizasyona gidilmesi ve belki o aşamada tanısal amaçlı kullanılması uygun olur.

KAYNAKLAR

- 1 - Anonymous : NOR's- a new method for the pathologist. Lancet, 1 : 1413-1414, 1987.
- 2 - Bancroft D.J., Stevens A., Turner D.R. : Cytoplasmic granüles, organelles and special tissues. "The theory and practise of histological techniques". Third edition, Churchill Livingstone, London, p:642-643, 1990.
- 3 - Bayındır Ç., Doğan Ö., Girişken G. ve ark.: Astrositomların malignite derecesi değerlendirilmesinde AgNOR yönteminin yeri. Türk Onkoloji Dergisi, 4 : 903-909, 1989.
- 4 - Benn P.A., Perle M.A. : Chromosome Staining and Banding techniques. (Ed:Rooney D.E., Czepulkowski B.H.) "Human cytogenetics". First edition, Irl Press Ltd. , Oxford, p: 71-73, 1986.
- 5 - Bloom W. and Fawcett D.W. : The cell and cell division. "A textbook of histology". Tenth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p: 35-74, 1975.
- 6 - Bockmühl U., Theissig F., Dimmer V. et al. : The impact of NOR for the lymph node spread and prognosis of Invasive ductal mammary carcinoma. Path. Res. Pract, 187:437-443, 1991.
- 7 - Boldy D.A.R. , Crocker J. , Ayres J.G. : Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. J.Pathalogy, 157 : 75-79, 1989.
- 8 - Brayn R.L. , Allcock R.A. , Crocker J. , et al. : NOR in squamous tumours of pharynx and larynx. Clin.Pathol., 42: 218-219, 1989.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KÜTÜPHANESİ

- 9 - Brayn R.L., Crocker J., Farr A. : NOR in kidney tumours and xanthogranulomatous pyelonephritis . J.Clin.Pathol., 43 : 147-148, 1990.
- 10- Burke A.P. , Sobin L.H. , Shekitka K.M. , et al . : Correlation of NOR and glandular dysplasia of the stomach and esophagus. Mod.Pathol., 3 : 357-360, 1990.
- 11- Buys C.H.C.M., Osinga J.: Abundance of protein bound sulphhydryl and disulphide groups at chromosomal nucleolus organising regions. Chromosoma, 77: 1-11,1980.
- 12- Ceylan İ. : Kalın barsak hastalıkları. "Cerrahi-A.Ü.T.F Yayınları" . 1.Basım , Yargıçoğlu Matbaası , Ankara , p: 448-460, 1981.
- 13- Cohen R.J., Glezerson G., Haffejee Z., et al.: Prostatic carcinoma : Histological and immunohistological factors affecting prognosis. Bri.J. Urology, 66: 405-410, 1990.
- 14- Contractor H. , Rüschoff J., Hanisch T., et al. : Silver stained structures in prostatic carcinoma :Evaluation of diagnostic and prognostic relevance by automated image analysis. Urol.Int., 46 : 9-14, 1991.
- 15- Coumbe A. , Mills B.P. , Brown C.L. : NOR in endometrial hyperplasia and neoplasia.Path.Res.Pract., 186: 254-259, 1990.
- 16- Crocker J., Boldy D.A.R., Egan M.J.: How should we count AgNOR's ? Proposals for a standardized approach . J.Pathol., 158: 185-188, 1989.
- 17- Crocker J., Carey M.P., Allcock R. :Hemangioblastoma and renal clear cell carcinoma , distinguished by means of the AgNOR method. Am.J.Clin.Pathol., 93: 555-557, 1990.
- 18- Crocker J., Egan M.J.: Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas . J.Pathol. , 156 : 233-239, 1988.

- 19- Crocker J. , Macartney J.C. , Smith P.J. : Correlation between DNA flow cytometric and NOR data in non-Hodgkin's lymphomas. *J.Pathol.*, 154 : 151-156, 1988.
- 20- Crocker J.,Mc Govern J.: NOR in normal cirrhotic and carcinomatous livers.*J.Clin.Pathol.*, 41:1044-1048, 1988.
- 21- Crocker J., Nar P. : NOR in lymphomas. *J.Pathol.*, 151: 111-118, 1987.
- 22- Cronin K., Loftus B.M., Dervan P.A. : Are AgNOR's useful in distinguishing follicular hyperplasia from follicular lymphoma ? *J.Clin.Pathol.*, 42: 1267-1268, 1989.
- 23- Cullimore J.E. , Rollason T.P. , Marshall T. : NOR in adenocarcioma in situ of the endocervix. *J.Clin.Pathol.*, 42: 1276-1280, 1989.
- 24- Das D.C. , Rani R. , Mitra A.B. : The number of silver staining NOR's (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. *Mechanism of Ageing and development*, 36 : 117-123, 1986.
- 25- Dayal Y. , De Lellis R.A. : The gastrointestinal tract., (Ed : Cotran R.S. ,Kumar V. , Robbins S.L.) " Robbin's pathologic basis of disease" Fourth edition,W.B.Saunders Company, Philadelphia, p: 891-902, 1989.
- 26- De Lozier , Blanchet C.D. , Walt H. , et. al. : Ectopic nucleolus organizer regions (NOR's) in human testicular tumours. *Cytogenet. cell genet.*, 41: 107-113, 1986.
- 27- Derenzini M.,Nardi F.,Farabegoli F.,et al.: Distribution of silver stained interphase NOR's as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cyto.*, 33: 491-498, 1989.
- 28- Derenzini M. , Pession A. , Farabegoli F. : Relationship between interphasic NOR's and growth rate in two neuroblastoma cell lines.*Am.J.Pathol.*,134:925-932, 1989.

- 29- Derenzini M., Romagnoli I., Ceccarelli C. : Fixatives and silver stainability of NOR proteins at the light microscopic level (letter). *J. Histochem. Cytochem.*, 36: 1453-1454, 1988.
- 30- Derenzini M., Romagnoli I., Mingazzini P., et al.: interphasic NOR distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumours of human intestine. *Virchows Archiv. B. Cell Pathol.*, 54 : 334-340, 1988.
- 31- De Rosa G., Staibano S., Barra E., et al. : NOR in aggressive and non aggressive basal cell carcinoma of the skin. *Cancer*, 69: 123-126, 1992.
- 32- Dervan P.A., Gilmartin L.G., Loftus B.M., et al.: Breast carcinoma kinetics : AgNOR counts correlate with Ki67 scores. *Am. J. Clin. Pathol.*, 92: 401-407, 1989.
- 33- Dervişoğlu S. , Girişken G. , Uzel M. ve ark. : Silver stained of NOR's in giant cell tumours of bone and clinical correlations. *Türk Patoloji Dergisi*, 8: 2-4, 1992.
- 34- Deschenes J., Weidner N. : NOR in hyperplastic and neoplastic prostate disease. *Am. J. Surgic Pathol.*, 14: 1148-1155, 1990.
- 35- Doğan Ö . : AgNOR sayı ve dağılım farklılıklarının nedenleri. *Türk Patoloji Dergisi*, 8: 2-7, 1992
- 36- Egan M. , Crocker J. : NOR in cutaneous tumours. *J. Pathol.*, 154: 247-253, 1988.
- 37- Egan M. , Freeth M. , Crocker J. : Intraepithelial neoplasia , human papilloma virus infection and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium . *Histopathology*, 13: 561-567, 1988.
- 38- Egan M. , Freeth M. , Crocker J. : Relationship between intraepithelial neoplasia of the cervix and the size and number of NOR's. *Gynecol., Oncol.* 36: 30-33, 1990.

- 39- Erkoçak A. : Hücre "Genel Histoloji, AÜTF Yayınları"
3.baskı, A.Ü.Basımevi, Ankara, p: 81-110, 1980.
- 40- Fallowfield M.E. , Dodson A.R. , Cook M.G. : NOR in
melanocytic dysplasia and melanoma. Histopathol., 13:
95-99, 1988.
- 41- Fine G., MAC.K. : Alimentary tract. (Ed: Kissane J.M.)
"Anderson's pathology" . Ninth edition the C. V. Mosby
Company, Missouri, p: 1175-1181, 1990.
- 42- Gillen P., Grace P.A., Dervan P., et al. : Predictive value
of NOR in prostatic carcinoma. Br.J.Surg., 75: 1263, 1988.
- 43- Giri D.D. , Nottingham J.F. , Lawry J. , et al. : Silver
binding NOR in benign and malignant breast lesions :
correlations with ploidy and growth phase by DNA flow
cytometry. J.Pathol., 157: 307-313, 1989.
- 44- Goodlad J.R. , Crocker J. , Ma Cartney J.C. : Nucleolar
ultrastructure in low and high grade non Hodgkin's
lymphomas. J.Pathol., 163: 233-237, 1991.
- 45- Griffiths A.P., Butler C.W., Roberts P., et al. : Silver
stained structures (AgNOR's), their dependence on tissue
fixation and absence of prognostic relevance in rectal
adenocarcinoma. J.Pathol., 159: 121-127, 1989.
- 46- Hall P.A., Crocker J., Watts A., et al.: A comparison of
NOR staining and Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's
lymphoma. Histopathology, 12: 373-381, 1988.
- 47- Hough M. R. , White B. N. , Holden J. J. A. : Relative
tumorigenicities of hybrid cells with and without
HSR - bearing chromosomes from a human melanoma cell
line. Int.J.Cancer, 44: 360-366, 1989.
- 48- Howat A.J. , Giri D.D. , Cotton D.W.K. , et al. : NOR in
spitz nevi and malignant melanomas . Cancer , 63 :
474-478, 1989.

- 49- Howat A.J. , Giri D.D. , Wright A.L. , et al. : Silver stained nucleoli and NOR counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma : J.Pathol., 156: 227-232, 1988.
- 50- Hubbell H.R., HSV IC. :Identification of NOR's in normal and neoplastic human cells by silver staining technique. Cytogenet.Cell Genet., 19: 185-196, 1977.
- 51- Jan Mohamed R.M. , Armstrong S.J. , Crocker J., et al. : The relation between number of interphase NOR's and NOR bearing chromosomes in non Hodgkin's lymphoma. J.Pathol., 158: 3-7, 1989.
- 52- Junquera L. C. , Carneiro J. , Contopoulos A. N. : Nucleolus . "Basic histology" . First edition , Lange Medical Publications , California , p : 51-60, 1975.
- 53- Kakeji Y., Korenaga D.,Tsujitani S., et al. : Predictive value of Ki67 and argyrophilic NOR staining for lymph node metastasis in gastric cancer. Cancer research , 51: 3503-3506, 1991.
- 54- Kaneko S. , Ishida T. , Sugio K. , et al. : NOR's as a prognostic indicator for stage I non small cell lung cancer. Cancer research, 51: 4008-4011, 1991.
- 55- Kanitakis J. , Hoyo E. , Hermier C. , et al. : NOR enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin . Cancer , 69 : 2937-2941, 1992.
- 56- Kuratsu S. , Aozasa K. , Myoui A., et al. : Prognostic significance of AgNOR staining in soft tissue sarcomas. Int.J.Cancer, 48: 211-214, 1991.
- 57- Kurvink K. , Monica K. , Porzucek L. : Acrocentric Interconnections and NOR variants in human lymphocytes . Cancer Genet.Cytogenet., 50: 207-226, 1990.

- 58- Lee F.D. : Alimentary tract. (Ed: Anderson J.R.) "Muir's textbook of pathology". Twelfth Edition, English Language book Society, London, p:19.62-19.66, 1985.
- 59- Leeson T. S. , Leeson C. R. , Paparo A. A. : The cell "Text / Atlas of Histology" . First Edition, WB.Saunders Company, Philadelphia, p: 23-101, 1988.
- 60- Leong A.S.Y., Gilham P.: Silver staining of NOR in malignant melanoma and melanotic nevi. Human Pathol., 20: 257-262, 1989.
- 61- Lipponen P.K., Eskelinen M.J. : NOR's in bladder cancer: Relation to histological grade, clinical stage and prognosis. Anticancer research, 11: 75-80, 1991.
- 62- Lloyd S.N., Johnson C.P., Braun I.L., et al.: NOR's in benign and malignant prostatic disease. Histopathology, 18: 449-452, 1991.
- 63- Loftus B.M., Gilmartin L.G., O'Brien M.J., et al.: Intratubuler germ cell neoplasia of the testis: Identification by placental alkaline phosphatase immunostaining and AgNOR quantification. Human Pathol., 21: 941-947, 1990.
- 64- Mamaeva S., Lundgren R., Elfving P., et al.: AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate. The Prostate, 18: 155-162, 1991.
- 65- Mc Meekin W., Mc Nicol K. and A. : Combined immunocytochemistry and NOR staining: Some technical aspects. Med.Labor.Science, 46: 11-15, 1989.
- 66- Merot Y., Durgniat A., Frenk E.: NOR in fibrohistiocytic tumors of the skin. J.Cutan.Pathol., 17: 122-126, 1990.
- 67- Miller O.J., Miller D.A., Dev V.G., et al.: Expression of human and suppression of mouse nucleolus activity in mouse -human somatic cell hybrids. Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 73: 4531-4535, 1976.

- 68- Moran K. , Cooke T. , Forster G. , et al . : Prognostic value of NOR's and ploidy values in advanced colorectal cancer. *Br.J.Surg.* , 76: 1152-1155, 1989.
- 69- Morson B.C. : Large Bowel. "Gastrointestinal pathology". Second edition , Blackwell Scientific Publications , Oxford, p: 522-564, 1972.
- 70- Morson B.C. , Sabin L.H. : "Histopathological typing of intestinal tumours, World Health Organization, No:15". First edition, Geneva, 1976.
- 71- Mourad W.A. , Balis B.E. , Livingston S., et al. : AgNOR in breast carcinoma . *Cancer* , 69 : 1739-1744, 1992.
- 72- Murray P.G. , Boldy D. A. R., Crocker J. , et al. : Sequential demonstration of antigens and AgNOR's in frozen and paraffin section .*J.Pathol.* , 159: 169-172, 1989.
- 73- Nikicicz E.P. , Norback D.H. : AgNOR staining in normal bone marrow cells . *J. Clin. Pathol.* , 43: 723-727 , 1990.
- 74- Ogura S., Abe S., Sukoh N., et al. : Correlation between NOR's visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. *Cancer*, 70: 63-68, 1992.
- 75- Ooms E.C.M., Veldhuizen R.W. : Argyrophilic proteins of the NOR in bladder tumours. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat.* , 414: 365-369, 1989.
- 76- Orita T. , Kajwara K. , Nishizaki I. , et al. : NOR's in meningioma. *Neurosurgery*, 26: 43-46, 1990.
- 77- Öfner D. , Tötsch M. , Sandbichler P. , et al. : Silver stained NOR proteins as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J.Pathol.* , 162: 43-49, 1990.
- 78- Öztürk S. , Doğan Ö. : Malign ekkrin poromada NOR'un önemi. *Türk Patoloji Dergisi*, 5: 24-31, 1989.

- 79- Papadimitiou C.S., Athanasiadou S., Stylianidou A., et al. : NOR in the normal, hyperplastic and carcinomatous epithelium of endometrium. Virchows Archiv B Cell Pathol., 60: 155-160, 1990.
- 80- Plate K. H., Rüschoff J., Behnke J., et al. : Proliferative potential of human brain tumours as assessed by NOR's and Ki67 immunoreactivity. Acta Neurochir., 104: 103-109, 1990.
- 81- Plate K.H., Rüschoff J., Mennel H.D.: NOR in meningioma; Correlation with histopathologic malignancy grading, DNA cytometry and clinical outcome. Anal.Quant.Cyto and Histo., 12: 429-438, 1990.
- 82- Raymond W.A., Leong A.S.Y. : NOR's relate to growth fraction in human breast carcinoma. Human Pathol., 20: 741-746, 1989.
- 83- Rosa J., Mehta A., Filipe M.I. : NOR's in gastric carcinoma and its precursor stages. Histopathology, 16: 265-269, 1990.
- 84- Rosa J. : Special techniques in surgical pathology. " Ackerman's surgical pathology " . Seventh edition, The CV. Mosby Company, Missouri, p : 45 - 46, 1989.
- 85- Rosa J. : Gastrointestinal tract. "Ackerman's surgical pathology" . Seventh edition, the CV. Mosby Company, Missouri, p: 594-615, 1989.
- 86- Rüschoff J., Bittinger A., Neumann K., et al.: Prognostic significance of NOR's in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. Pathol.Res.Pract., 186: 85-91, 1990.
- 87- Rüschoff J., Plate K.H., Bittinger A. : Application of the AgNOR method to cell imprints-letter. J.Pathol., 158:333, 1989.

- 88- Rüschoff J. , Plate K.H. , Contractor H. , et al. : Evaluation of NOR's by automatic image analysis : A contribution to standardization. *J.Pathol.*, 161:113-118, 1990.
- 89- Sandberg A. A. : Differential staining of the nucleolus organizers in human chromosomes. " The chromosome in human cancer and leukemia " . Second edition , Elsevier science publishing Co.,Massachusetts, p: 82-85, 1990.
- 90- Sato Y., Abe S., Kubota K., et al. : Silver stained NOR in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Philadelphia chromosome - positive chronic myelocytic leukemia patients. *Cancer Genetic Cytogenetic*, 23: 37-45, 1986.
- 91- Shiraishi T. , Iabuchi K. , Mineta I. , et al. : NOR in various human brain tumors.*J.Neurosurg.*,74:979-984,1991.
- 92- Smith P. J. , Skilbeck N. , Harrison A. , et al. : The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J.Pathol.*, 155: 109-112, 1988.
- 93- Soomro I. , Patel N. , Whimster W.F. : Distribution and estimation of NOR's in various human lung tumours. *Path. Res.Pract.*, 187: 68-72, 1991.
- 94- Soosay G.N. , Griffiths M. , Papadaki L. , et al. : The differential diagnosis of epithelial - type mesothelioma from adenocarcinoma and reactive mesothelial proliferation. *J.Pathol.*, 163: 299-305, 1991.
- 95- Suresh U.R., Chawner L., Buckley H., et al. : Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation ? A study of trophoblastic tissue . *J.Pathol.*, 160: 213-215, 1990.
- 96- Terasaki S., Terada T., Nakanuma Y., et al. :AgNOR's and alpha - fetoprotein in adenomatous hyperplasia in human cirrhotic livers. *Am.J.Clin.Pathol.*, 95: 850-857, 1991.

- 97- Tham K.Y. , Page D.L. : AgNOR and Ki67 breast lesions-
editorial. Am.J.Clin.Pathol., 92: 518-520, 1989.
- 98- Watson M.G., Crocker J.: Non-Hodgkin's lymphoma involving
the tonsil : An immunohistochemical study. J.Laryngology
and otology, 105: 445-450, 1991.
- 99- Wilkinson N. , Buckley C.H. , Chawner L., et al. : NOR's
in normal , hyperplastic and neoplastic endometria. Int.
J. Gynecol. Pathol., 9:55-59, 1990.
- 100-Wood D. A. : " Tumors of the Intestines-Armed Forces
Institute of Pathology". First edition. National Academy
of Sciences, Washington, p: 121-189, 1967.
- 101-Wrba F. , Augustin I. , Fertl H. : NOR's in soft tissue
sarcomas. Oncology, 48: 166-170, 1991.
- 102-Yang P. , Huang G.S. , Zhu X.S. : Role of NOR's in
differatiating malignant from benign tumours of the
colon.J.Clin.Pathol., 43: 235-238, 1990.