TİROİD PAPİLLER KARSİNOM VE NORMAL TİROİD HÜCRE ÇEKİRDEKLERİNDE AgNOR SAYISININ DEĞERLENDİRİLMESİ*

Evaluation of AgNOR Spot Number in Thyroid Papillary Carcinoma and Normal Cells Nuclei

Recep ERÖZ[1], Nurhan CÜCER[2], Kürşad ÜNLÜHIZARCI[3], Figen ÖZTÜRK[4]

Özet : *Tiroid kanserleri, klinikte görülen kanserlerin %1 kadarını oluşturup, yavaş ilerleyen tümörlerdir. Genelde yaşam süresi iyi olmakla beraber, tüm endokrin organ kanserlerinden daha fazla ölüme neden olmaktadırlar. Hücre çekirdeğinde bulunan çekirdekçik organize eden bölgeler (nucleolus organizer regions, NORs) insanda bulunan beş çift akrosentrik kromozomun (13,14,15,21 ve 22. kromozomlar) ikincil boğumlarına yerleşmiş, ardışık olarak yinelenen rRNA gen ailesidir. İnterfazda transkripsiyonel olarak aktif olan NOR'lar, gümüş nitrat ile seçici olarak boyanabilirler. Benign ve malign tiroid lezyonlarını AgNOR boyama tekniği ile karşılaştırmak için, 15 kontrol ve 15 tiroid papiller kanserli bireyden oluşan iki grup çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir bireyin preparatı AgNOR boyama tekniği ile boyanmış ve özel bir bilgisayar programı kullanılarak her bir çekirdek için toplam AgNOR sayısı değerlendirilmiştir. Her bir bireyden 100 çekirdek değerlendirilmiş ve her biri için ortalama NOR sayısı değerleri hesaplanmıştır. Bulgulara göre kontrol grubunun ortalama NOR sayısı 1.302±0.122 bulunmuştur. Aynı değer tiroid papiller kanser grubunda 4.564±1.001 bulunmuştur. Veriler Mann Whitney-U testi ile istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Bu bulgulara göre, kontrol ve tiroid papiller kanser grubu bireylerin ortalama NOR sayıları arasında anlamlı bir istatistiksel fark tespit edilmiştir (p=0,0001, z=4,666). Sonuç olarak NOR sayısının benign ve malign tiroid lezyonlarını ayırmada kullanışlı bir araç olacağı kanısındayız.*

Anahtar kelimeler: *Tiroid, NOR, AgNOR*

Summary: *Thyroid cancers constitute 1% of clinical cancer cases and develops slowly. Althought the survival time of patient is favorable, its mortality is greater than all endocrin tissue cancers. The NORs are tandemly repeated rRNA gene family found in secondary constrictions of the five pair of acrocentric chromosomes. In interphase, transcriptionaly activated NORs are selectively stained with $AgNO_3$.*

To compare the benign and malign thyroid lesions by AgNOR staining technic, 15 individual in control, and 15 in thyroid papillary cancer group were involved. AgNOR staining technic was applied to the slides of each individual, and AgNOR number was evaluated for each nucleus, using a special computure programme. From each individual, one hundred nuclei were analyzed and the mean NOR number/nucleus were evaluated. According to the data, mean NOR number of controls was found to be 1.302±0.122. Also in cancer group mean NOR number were found to be 4.564±1.001. The datas were compared with Mann Whitney-U test as statistical. According to this data, a significant difference was evident between the mean NOR number of control and cancer groups indivudials (p=0.0001, z=4.666).

In conclusion, we think that evaluation of mean NOR number is a useful diagnostic tool in benign and malign lesions.

Keywords: *Thyroid, NOR, AgNOR*

[1] *Uzm.Dr.Erciyes Ün, Sağlık Bil.Ens. Tıbbi Biy. AD, Kayseri*
[2] *Prof.Dr.Erciyes Ün, Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri*
[3] *Prof.Dr.Erciyes Ün, Tıp Fak. İç Hastalıkları AD, Kayseri*
[4] *Prof.Dr.Erciyes Ün, Tıp Fak. Patoloji AD, Kayseri*

Geliş Tarihi : 08.03.2010 Kabul Tarihi : 28.07.2010

Tiroid terimi Grekçe'deki kalkan şekilli anlamına gelen thyreoides kelimesinden köken alır. İlk olarak bu bezi Galen (Galenos M.S.129-198) tarif etmiştir. Tiroid ismi ise 1656 yılında denographia adlı eserinde Thomas Wharton tarafından kullanılmıştır (1).

**** Bu çalışma aynı adlı Doktora tezinden özetlenmiştir.***

Tarihte ilk defa tiroid bezine cerrahi girişimi Egina'lı Paulus gerçekleştirmiştir (2). Tiroid kanserleri, over kanserinden sonra en fazla rastlanan bir endokrin sistem kanseridir (3).

NOR'lar, beş çift akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22'nci çiftler) ikincil boğumu olarak nitelendirilen satellit saplarında yerleşmiş olan ve aktifken gümüş ile boyanabilen ribozomal gen bölgeleridir. NOR'lar ile ilgili olan proteinler, gümüş iyonlarını bağlayarak seçici olarak boyanabilen, asidik non-histon tip proteinlerdir. Gümüş transkripsiyonel olarak aktif olan ya da transkribe edilebilen rDNA bölgelerine bağlanır ve rRNA nın nonhiston proteinlerine tutulu kalır (4). Ribozomal RNA genleri (rRNA) aktif transkripsiyon süresince RNA polimeraz I ile çekirdekçikte yer alırlar. İnsan diploid hücrelerinde NOR'lar, akrosentrik kromozomların kısa kollarında ribozomal RNA (rRNA) için şifrelenen ardışık olarak yinelenen çok sayıdaki ribozomal genlerin yaklaşık 300-400 kopyasını içerirler (5). Ribozomal genlerin transkripsiyonel aktiviteleri gümüş ile boyanma yoğunluğu ile ilişkilidir (6,7). Transkripsiyonel olarak aktif olan rDNA kümeleri, AgNOR boyama ile belirlenebilir (8). Bu teknikle NOR'larda bulunan asidik proteinler (AgNOR proteinleri) boyanır. İnterfaz süresince NOR'lar çekirdekçik ile ilişkilidir (9). AgNOR proteinleri çekirdekçiğin ipliksi merkezinde yerleşir ve metefaz NOR'larının karşılığını göstermek için kullanılırlar (10). Bu nedenle AgNOR boyama, interfaz çekirdeğindeki çekirdekçikleri göstermek için (11,12) ya da metafaz kromozomlarındaki aktif NOR yerleşimini belirlemek için (13,14) kullanılan en güvenilir metodlardan biridir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrin polikliniğine başvuran 15 kontrol ve 15 tiroid papiller karsinom hasta grubuna ait bireylerin tiroid hücre çekirdekleri üzerinde yapılmıştır. Hastalardan alınan biyopsiler, oda sıcaklığında havada kurutulmuştur. Daha sonra metanolde 10 dakika fikse edilerek tiroid hücrelerinin lam üzerine sabitlenmesi sağlanmıştır. Daha önceden tespit edilmiş olan kontrol grubunu oluşturan bireylere ait parafin bloklar arşivden çıkartılmıştır. Daha sonra mikrotom yardımıyla bu bloklardan 3 mikronluk kesitler alınıp bir fırça yardımıyla su banyosu içerisine konulmuş ve buradan da bir lamın üzerine alınmıştır. Bu lam parafin bloğun erimesi için ısıtıcı bir tabla üzerinde yaklaşık olarak 15 dakika bekletilerek deparafinizasyona tabi tutulmuştur. Parafin eridikten sonra üzerinde doku bulunan bu lam daha önceden hazırlanmış olan bir şalenin içerisindeki ksilole konularak 15 dakika bekletilmiş ve sırasıyla azalan etil alkol serilerinde (%100, %96 ve % 70'lik) 5'er dakika bekletilmiştir. Alkol serilerinden çıkarıldıktan sonra 5 dakika distile suda bekletilmiş ve oda sıcaklığında kurutularak NOR boyama işlemine hazır hale getirilmiştir.

Luther E. Lindner tarafından kullanılan gümüş boyama metodu (15) hafif değiştirilerek AgNOR boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Preparatlar ilk önce 10 dakika metanolde bekletilerek fiksasyon sağlanmış ve daha sonra havada kurutulmuştur. Havada kurutulan preparatlar daha sonra içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kâğıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine pastör pipeti ile gümüş boyama solüsyonundan 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır.

Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde aliminyum folyo ile sarılıp 37 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15.dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su ile yıkanmıştır.

Sonuçta tüm preparat üzerindeki bütün bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen AgNOR boyanmalar elde edilmiştir.

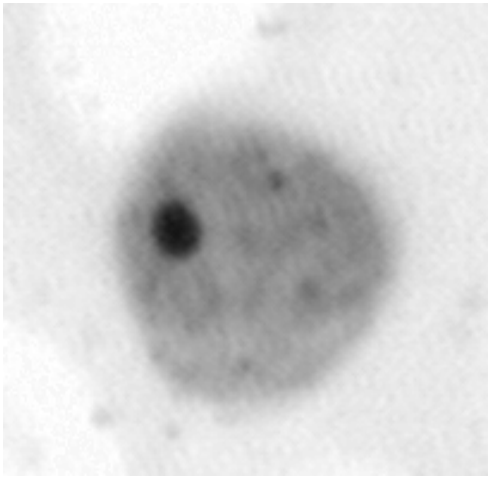
İstatistiksel Analiz

Kontrol grubu ile tiroid papiller kanser tanısı almış olan bireylerin NOR sayılarının değerlendirilmesi ile elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini sınamak için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Veriler normal dağılmadığı için bağımsız grupların ikili karşılaştırmalarında, nonparametrik testlerden Mann Whitney-U testi kullanılmıştır.

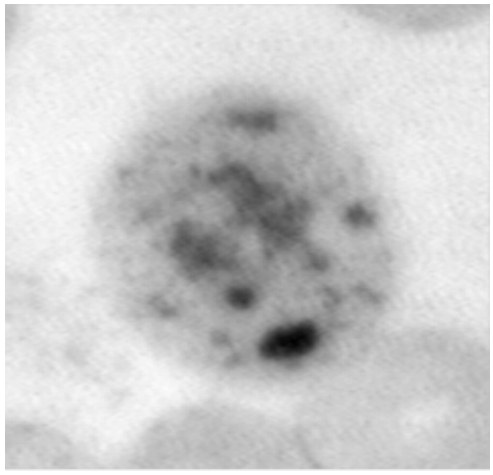
BULGULAR

Çalışmamıza 32-66 yaş grubu arasında 15 kontrol, 28-81 yaş grubu arasında 15 tiroid papiller karsinom tanısı almış olan birey dahil edilmiştir.

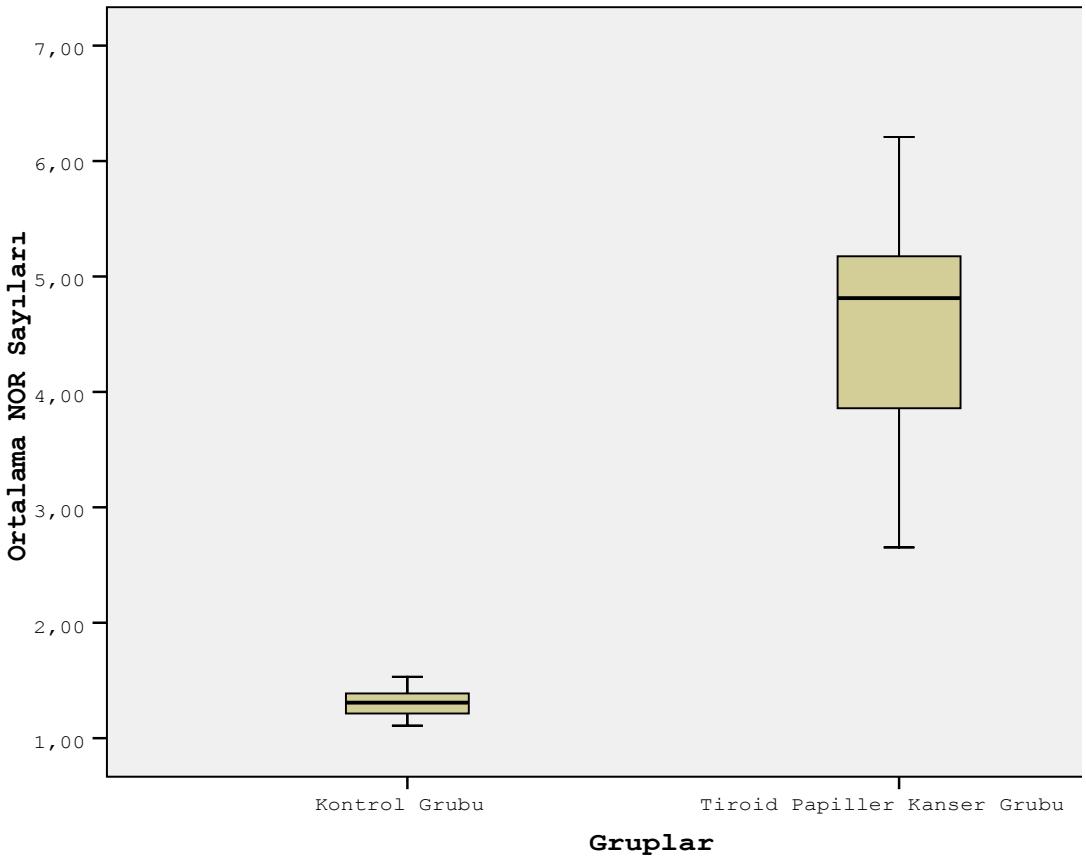
Her bir bireyden 100 çekirdek değerlendirilmiş ve her biri için ortalama NOR sayısı değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra her bir grup için standart sapmalar hesaplanmıştır. Bulgulara göre kontrol grubunun ortalama NOR sayısı 1.302±0.122 bulunmuştur (Tablo I). Aynı değer tiroid papiller kanser grubunda 4.564±1.001 bulunmuştur. Her bir grubun NOR sayısı ortalamaları kullanılarak Box Plot grafiği çizilmiştir (Şekil 1). Verilerimize göre, kontrol ve tiroid papiller kanser grubu bireylerin ortalama NOR sayıları arasında anlamlı bir istatistiksel fark tespit edilmiştir (p=0,0001, z=4,666).



Resim 1. Kontrol grubu hücresi çekirdeği



Resim 2. Tiroid papiller kanser grubu hücresi çekirdeği



Şekil 1. Her bir grubun NOR sayısı ortalamalarının Box Plot grafiği ile gösterimi

Tablo I. Varyans analizi uygulanmış kontrol ve tiroid papiller kanser gruplarının N, n değerleri ve standart sapmaları

Gruplar	**N**	**n**	**NOR Sayısı (Ort. ±SD) O.D. (%25;%75)**	**P**
Kontrol	15	1500	1.302±0.122 1.308 (1.210;1.403)	0,0001
Tiroid papiller kanser	15	1500	4.564±1.001	

N:Gruptaki birey sayısı **O.D**.: Ortanca (median)
n:İncelenen toplam hücre sayısı **Ort.**: Ortalama **SD**:Standart sapma

TARTIŞMA

AgNOR sayısı, benign ve malign lezyonları patolojik materyaller üzerinden ayırt etmede çok çeşitli neoplastik örneklere uygulanmaktadır (16). Bu alanda kullanılan diğer teknikler ise, hücre çoğalmasının göstergesi olmak üzere, PCNA, Ki-67 ekspresyonlarındaki artışların immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesidir (17-20). Ancak, bu yöntemlerin hem malign hem benign lezyonları birbirinden ayırt etmede, hem de malign lezyonların kendi aralarında ayırıcı tanılarında sağladıkları başarı oranları değişkenlik göstermektedir (17,21).

Ag-NOR proteinleri bölünen hücrelerde hızlı bir şekilde biriken, gümüş seven bir çekirdekçik protein setidir (22,23). Ayrıca, bu proteinlerin ekspresyonu bölünmeyen hücrelerde çok düşüktür. Doğal ortamında Ag-NOR proteinlerinin ekspresyonu, morfometrik ve görüntü analizlerinin kullanılarak gümüş boyanma düzeylerinin tespit edilmesi ile ölçülebilir. Rastgele seçilmiş olan hücrelerdeki Ag-NOR proteinlerinin ortalama olarak miktarlarının tespit edilmesi kanser hücrelerinin çoğalma potansiyelinin önceden tespit edilmesine olanak sağlar (24). Ag-NOR proteinlerinin miktarının hücre katlanma zamanı ile ilişkili olduğu önerilmektedir (23). Hücre siklusu süresince, siklusun en hızlı olduğu zamanda en fazla miktarda Ag-NOR proteini sentezlenmektedir (25).

Bulgularımız da literatür bilgisiyle uyumlu olup, ortalama NOR sayıları oranlarının hızlı kontrolsüz hücre çoğalması olan kanserli bireylerde önemli derecede yükseldiğini ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık bölünmenin kontrol altında bulunduğu kontrol grubunda yer alan, erişkin sağlıklı bireylerde tiroid dokusu gelişimini tamamladığından ve hücreler dinlenim durumunda olduğundan, kontrol grubu bireylerinde NOR sayısı değerleri düşük olarak elde edilmiştir.

Aynı grup içerisindeki bireyler yaşa göre kıyaslandığında; kontrol grubu ve kanser grubunda grup içi ortalama NOR sayısı ile hasta yaşı arasında bir ilişki olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, AgNOR leke sayısı benign ve malign tiroid hücrelerini birbirinden ayırt edebilen faydalı bir yöntem olarak gözükmektedir.

KAYNAKLAR

1. *Sadler GP, Clark OH, Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC. Thyroid and parathyroid. Principles of surgery,7th ed. McGraw-Hill. New York.1999; 36:1661-1687.*
2. *Ureles AL. Thyroidology-Reflections on Twentieth Century history. Falk S (ed) Thyroid Disease. Raven Press. New York.1990; 1: 1 -14.*
3. *Hurng-Seng Wu J,Young M.T, Clark O.H.Tiroid Kanserlerine Genel Bakış. İşgör A (ed). Tiroid hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul. 2000; 8: 367-372.*
4. *Trere, D. AgNOR staining and quantification. Micron 2000; 31: 127–131.*
5. *Hernandez-Verdun D, Louvet, E. Le nucleole: fonctions et maladies associe´es. Med. Sci. (Paris) 2004; 20: 37–44.*
6. *Hubbell HR. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. Stain Technol 1985; 60: 285–294.*
7. *Jime`nez R, Burgos M. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. Heredity 1988; 60: 125–127.*
8. *Capoa A, Felli MP, Baldini A, Rocchi M, Archidiacono N, Aleixandre C, Miller OJ, Miller DA. Relationship between the number and function of human ribosomal genes. Hum. Genet 1988; 79:301–304.*
9. *Green JE, Rosenbaum KN, Rapoport SI, Schapiro MB, White BJ. Variant nucleolus organizing regions and the risk of Down syndrome. Clin. Genet 1989; 35: 243–250.*
10. *Derenzini M, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centres of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. Exp. Cell Res 1987; 170: 31–41.*

11. Demirtas H, Candemir Z, Cucer N, Imamoglu N, Donmez H, Bokesoy I. Essay on the nucleoli survey by the a- and b-satellite DNA probes of the acrocentric chromosome in mitogen-stimulated human lymphocytes. Ann. Ge´ne´t-Paris 2000; 43: 61–68.

12. Trere, D. AgNOR staining and quantification. Micron 2000; 31: 127–131.

13. Sumner AT. Nucleolar organizers. In: Sumner, A.T. (Ed.), Chromosome Banding. Unwin Hyman, London, pp. 1990; 187–205.

14. Imamoglu N, Demirtas H, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Ilten A. NORs Expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium. Cytometry Part B-Clin Cytom. 2005a; 66B: 36–39.

15. Lindner LE. Improvements in the Silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). J Histochem Cytochem 1993; 41(3): 439-445.

16. Trere D, Migaldi M, Trentini GP. Higher reproducibility of morphometric analysis over the counting method for interphase AgNOR quantification. Anal. Cell. Pathol. 1995; 8(1):57-65.

17. Augustynowicz A, Dzieciol J, Barwijuk-Machala M,Dadan J, Puchalski Z, Sulkowski S. Assessment of proliferative activity of thyroid Hürthlecell tumors using PCNA, Ki-67 and AgNOR methods. Folıa Hıstochemıca Et Cytobıologıca. 2004;42:165-168.

18. Lewy-Trenda I, Janczukowicz J, Wierzchniewska-Lawska A. Practical application of proliferation markers' (MIB-1, PCNA, AgNOR) expression analysis for differential diagnostics of nodular thyroid lesions. 2006; 59:32-7.

19. Slowinska-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, et al. Multiparameters analyses of AgNOR in thyroid lesions: comparision with PCNA expression. Histopathol 2004; 19:785-792.

20. Mehrotra A, Goel M.M, Singh K. Ki-67 and AgNOR proliferative markers as diagnostic adjuncts to fine needle aspiration cytology of thyroid follicular lesions. 2002; 24:205-211.

21. Mehrotra A, Agarwal P.K, and Chandra T. Cytopathology and AgNOR Counts in Fine-Needle Aspiration Cytology Smears of Thyroid Lesions. Diagnostic Cytopathology. 1998;19:238-243.

22. Carbajo S, Orfao A, Vicente-Villardon JL, Carbajo-Pe´rez E. Expression of silver-stained nucleolar organizer regions is coupled to cell cycle in rat thymic cells. Cytometry 1993; 14:46–52.

23. Derenzini M, Sirri V, Trere´ D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. Lab Invest 1995; 73:1–6.

24. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. Int Rev Exp Pathol 1992; 32:149–192.

25. Brugal G. Interpretation of proliferation markers. Virchows Arch 1995; 427:337–339.