T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Proje No:TSA-091111

Proje Türü: Bilimsel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Nurhan CUCER
Tıbbi Biyoloji AD

Araştırmacılar
Yrd. Doç. Dr. Recep Eröz (Düzce Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Genetik AD), Yrd. Doç. Dr. Abdullah (Demirtaş Erciyes Üniv. Tıp Fak. Üroloji AD)

Eylül 2013
KAYSERİ

BU PROJE ERÜBAP TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR

Teşekkür ederiz

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	6
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
4. BULGULAR	12
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	17
6. KAYNAKLAR	20

MESANE KANSERİNDE PROGNOZ İLE TOPLAM AGNOR ALANI / ÇEKİRDEK ALANI ARTISI İLİSKİSİNİN İDRARDAKİ HÜCRELERDE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Arjirofilik nukleolus organize edici bölge proteinleri (AgNORs), akrosentrik kromozomların sekonder darlık bölgelerinden sentezlenmekıtedirler. Bu merkezler, gümüşle boyanmış interfaz nukleuslarında görünür haldedirler. Çalışmamızın amacı, , "AgNOR sayısı/ çekirdek sayısı", Toplam "AgNOR alanı/ çekirdek alanı (TAA / ÇA)", "AgNOR boyanma yoğunluğu" ve "AgNOR kütlesi" değerleri üzerinden, mesane kanserli ve normal bireylerin idrar örneklerdeki hücrelerin değerlendirilerek, karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 11 sağlıklı ve 24 mesane kanserli birey dahil edilmiştir. Mesane hücreleri, kontrol ve hasta grubu bireylerin idrar örneklerinden, santrifüjleme yöntemiyle elde edilerek, preparatlar hazırlanmıştır. Her bireyden 100 hücre seçilip, her birinin tüm AgNOR parametreleri sayım, hesaplama, ölçme metodları ile belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler için ***SPSS Software (ver. 15.0.)*** kullanıldı. Bulgular "Mean ± Standard deviation" olarak verildi. "***Bayesian statistics, based on receiver operating characteristic (ROC)-derived cutoff*** **"** değerleri, her bir AgNOR parametresinin ayırıcı tanıda yararlı olma potansiyelini değerlendirmek için belirlendi. Gruplar ın her bir parametre için karşılaştırılmasında ise ***students' t*** testi kullanıldı.

Results: Mesane kanserli hastaların AgNOR sayısı/nukleus sayısı, TAA / NA, AgNOR protein kütlesi değerleri kontrol grubuna ait değerlere göre oldukça yüksek çıkmıştır (hepsi için $p < 0,001$). Hasta ve kontrol grubu arasında AgNOR boyanma yoğunluğu anlamlı bir fark göstermemiştir ($p= 0,135$). Kanser alt gruplarına ait AgNOR değerleri de anlamlı derecede farklı ($p<0,05$) bulunmuştur.

Karar: İdrardan elde edilen döküntü mesane hücreleri, AgNOR parametreleri üzerinden, benin ve malin lezyonların, ayrıca, mesane kanseri alt gruplarının ayırt edilmesinde kullanılabilir.

Keywords: NOR, AgNORs, Mesane kanseri

ABSTRACT

Aim: Argyrophilic nucleolar organising region associated proteins (AgNORs) are synthesized from secondary constriction of acrocentric chromosome. These centers are visible in interphase nuclei when examined after a silver staining. The aim of this study was determination and comparison of the AgNOR count/nucleus and ‘‘Total AgNOR area/ nuclear area’’ (TNA / NA), AgNOR staining density and mass of these proteins in cases with urinary bladder carcinoma and healthy individuals.

Materials and Methods: Eleven healthy individuals and twentyfour cases with urinary bladder carcinoma were included in the study. Those bladder cells obtained from their urine were stained for AgNOR detection according to a specific protocol. One hundred nuclei per individual have been evaluated, and all AgNOR values of individual cells were detected for each individual. Statistical analyses was performed using ***SPSS Software (ver. 15.0.)*** Data were given as Mean ± Standard deviation. ***Bayesian statistics, based on receiver operating characteristic (ROC)-derived cutoff*** values vere faund for detection of the parameters’ potential in differential diagnosis. Control and patient groups compared for each AgNOR parameter using ***students’ t*** test.

Results: The cases with urinary bladder carcinoma had significantly higher AgNOR count/nucleus, TAA / NA, AgNOR protein mass values than those of control groups (all p values < 0,001), but not for AgNOR staining density (p= 0,135). The differences between cancer subgroups for AgNOR values were significantly different too (p<0,05). **Conclusion:** The exfoliative bladder cells obtained from urine of individuals who compatible with urinary bladder cancer may be used via AgNOR staining technique to distiguish between malign and benign, and also between malign subgroup lesions.

Keywords: NOR, AgNORs, urinary bladder cancer

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışmanın amacı mesane kanseri şüphesi taşıması nedeniyle opere edilen ve postoperatif histopatolojik materyali malign çıkan bireylerin idrarlarından elde edilen tranzisyonel epitelyal hücreleri ile mesane tümörü olmayan sağlıklı bireylerin idrarlarından elde edilen tranzisyonel epitelyal hücrelerde, her bir hücrenin toplam AgNOR sayısı ve AgNOR alanı / Çekirdek alanı (TAA/ÇA), AgNOR boyanma yoğunluğu ve AgNOR kütlesi değerlerini bu iş için yaptırılmış olan özel bir bilgisayar programı kullanarak hesaplayarak malign ve benign bireylerin ayırıcı tanısında bu AgNOR ların her biri cutoff değerlerinin verilmesi amaçlanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucu bir fark bulunması mesane kanseri taşıyan bireylerin ameliyat öncesi basit, kolay ve oldukça ucuz bir yöntem olan idrardan elde edilen hücrelerle daha önceden tespit edilmesi ve bu yöntemin tanı amacı ile kullanılabilir bir yöntem olabilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

Mesane kanseri (MK) dünya genelinde en yaygın kanserler arasında yer almaktadır. Yeryüzünde yaklaşık olarak 2,7 milyon insanın mesane kanseri geçmişine sahip olduğu bilinmektedir. MK, gelişmiş toplumlarda tüm dünya üzerinde en yüksek insidansa sahip olmasına rağmen, MK' nın getireceği yükün dünyanın az gelişmiş bölgelerinde daha da artabileceği tahmin edilmektedir. Bunun nedeni ise, MK için risk faktörüne maruz kalma açısından küresel değişiklikler, büyüme ve dünya popülasyonunun yaşlanmasından kaynaklanabilir **(**Ploeg M et al. 2009**).**

Transizyonel hücre karsinomu mesane karsinomasının %90' nından daha fazlasının orjinidir ve % 70-80' i süperfisial, %20-30' u invazif tümörler arasında sınıflandırılmaktadır **(**Modlich O et al. 2004**,** Raman JD et al. 2005**).** Mesane kanserine uygun bir şekilde yaklaşım, tümörün biyolojik potansiyelinin tam değerlendirilmesi ve belirlenmesini gerektirir. Histolojik olarak

belirlenmiş tümör gradeleri ve tümör evreleri tedavi stratejisinin uygulanmasında birincil prognostik değişkenlerdendir. Mesane kanserinin farklı tiplerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve onların farklı biyolojik potansiyellerinin belirlenmesi için ciddi manada araştırmalar yapılmaktadır. **(**Stein JP et al. 1998**).** Geleneksel olarak kullanılan kriterler transizyonel hücre karsinomalı mesane kanserinin nüksetmesini tam bir şekilde önceden bildirmek için yeterli değildir **(**Cucer N et al. 2007**).** Hücrenin proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesi tümörlerin histolojik sınıflandırılmasına yardımcı olması açısından önemlidir **(**Shiina H et al. 1996**).**

Çekirdekçik organize edici bölgeler (NORlar), ribozomal ribonükleik asitleri (rRNA) transkribe eden ve insan akrosentrik kromozomlarının (13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlar) ikincil boğumu olarak bilinen satellit köklerinde yerleşen, ribozomal deoksiribonükleik asit ilmekleridir (rDNA) ve çekirdekçiğin oluşumuna neden olurlar. Çekirdekçiğin aktif zonunda (fibrillar ve yoğun fibrillar merkez) NOR proteinleri bulunmaktadır ve bunlar formik asit varlığında gümüş nitratı metalik gümüşe indirgemektedir **(**Goodman MT et al. 1988**,** Howell WM, 1982**).**

Gümüşle boyanmış görünen NOR'lar ve NOR ile ilişkili arjirofilik proteinler sırasıyla, AgNOR'lar ve AgNOR'larla ilişkili proteinler olarak adlandırılırlar (Trere D, 2000). Gümüş boyama tekniği ile transkripsiyonel olarak aktif NOR'lar ve bunlarla ilgili olan arjirofilik proteinler görüntülenebilir (Bukhari MH et al. 2007, Trere D 2000).

Histopatoloji'de, interfaz AgNOR proteinlerinin analizleri preneoplastik ve neoplastik lezyonların ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. **(**Kuno T et al. 2006**).** Mesane kanserinde tümörün biyolojik potansiyelinin uygun bir şekilde yönetilebilmesi için birçok prognostik marker araştırılmış ve bu biyomarkırların büyük çoğunluğu mesane kanserinin teşhisi ve terapötik hedeflerin tespit edilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Bununla beraber bu markırlar prognozun belirleyicisi olarak sınırlıdırlar. **(**Stein JP et al. 1998**,** Han M and

Shoenberg M, 2000**).** AgNOR miktarı birçok kanser tipinde hücresel proliferatif aktivitenin bir parametresi olmaktadır **(** Shiina H et al. 1996, Cucer N et al. 2007 Eroz R et al. 2013, Eroz R et al. 2011, Eroz R et al. 2010, Eroz R, Unluhizarcı K et al. 2012**).**

Ploton ve arkadaşları (1986) AgNOR ların normal ve kanserli hücrelerde daha fazla sayıda olduğunu ve bunların formik asit varlığında gümüş nitratı metalik gümüşe indirgediklerini bildirmişlerdir **(**Ploton D et al. 1992). Son zamanlarda AgNOR miktarının hücre çoğalması için iyi bir ölçüt olduğu açıkça gösterilmiştir **(**Crocker J et al. 1988, Cucer N et al. 2007, Eroz R et al. 2013, Eroz R et al. 2011, Eroz R et al. 2010, Eroz R, Unluhizarcı K et al. 2012**).** Bu nedenle AgNOR miktarının değerlendirilmesi kanser dokularının çoğalması hakkında bilgi elde etmek **(**Devran PA et al. 1989**)** ve kanser gelişiminin potansiyel olarak değerlendirilmesi için iyi bir örnektir **(**Bostock DE et al. 1989**).** Bununla beraber, rDNA'nın transkripsiyonel aktivitesine göre hücre aktivitesi, indirekt olarak AgNOR parametrelerinin (AgNOR alanı, AgNOR sayısı, çekirdekçik çapı veya bu değerlerin toplamının, incelenen çekirdek sayısına oranı ve AgNOR alanının çekirdek alanına bölünmesiyle elde edilen AgNOR oranı) sayım ya da ölçümü ile değerlendirilebilir **(**Ploton D et al. 1986, Derenzini M 2000, Garcia-Moreno LM et al. 2001, Raska I et al. 2006, Sirri V et al. 2008, Hayashida M et al. 2009**).** AgNORlar ile çoğalan hücre nüklear antijeni (PCNA) (Ploton D et al. 1986) ve Ki 67, **(**Canepa M et al. 1990**,** Soomro IN et al. 1990**)** gibi diğer hücre proliferasyon markırları arasında önemli bir ilişki vardır. Bu nedenle AgNOR boyama interfaz çekirdeğindeki çekirdekçiği **(**Trere D 2000**)** ve metafazda kromozomlar üzerindeki aktif NOR bölgelerini göstermek için kullanılan en önemli metodlardan biridir **(**Imamoglu N et al. 2005**).** Bu özelliğinden dolayı AgNOR boyama yönteminin çeşitli dokulara başarılı bir şekilde uygulandığı birçok çalışma vardır **(**Cucer N et al. 2007, Eroz R et al. 2011, Eroz R et al. 2010, Eroz R, Okur M, Ozkan A. 2012, Eroz R, Unluhizarcı K et al. 2012, Eroz R, Tasdemir S et al. 2012**).**

GEREÇ VE YÖNTEM

Projemiz için Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan Onay alındı. Gönüllü bilgilendirme ve Gönüllü onam formları hazırlanıp kullanıldı.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan ve herhangi bir hastalığı bulunmayan gönüllü sağlıklı bireylerin her birinden 2 adet 20ml'lik falkon tüplerine idrar alınarak, 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilip süpernatan kısmı atıldı. Daha sonra her bir falkon tüpüne 2 ml metanol eklenerek 1 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak üzerine 1ml metanol eklenip iyice pipetaj işlemine tabi tutulup, yayma yapılarak havada kurutuldu. 1:3 asetik asit : metanol fiksatifte 10 dakika fikse edildi. Sonra alimünyum folyo ile sarılmış nemli petri kaplarında yayma preparatlarına %2'lik jelatinli formik asit ve %50 $AgNO_3$ karışımı ile hazırlanmış boya solüsyonu damlatılarak 37 ^{0}C'lik etüvde 15 dakika bekletilerek $AgNO_3$ ile çekirdekçik oluşturan bölge ile ilgili NOR proteinlerinin boyanması sağlandı. Preparatlar etüvden çıkarıldıktan sonra sudan geçirilerek preparatlardaki hücrelerin mikroskoptaki görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Özel bir bilgisayar programı yardımı ile her bir hücre için ortalama AgNOR sayısı ve AgNOR alanı / Çekirdek alanı değerleri (TAA/ÇA), AgNOR protein kütlesi ve AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu hesaplandı. Bu işlemler her bireyden analize uygun 100'er hücre seçilip, her bir hücre için ayrı ayrı tespit edildi. Ölçümler tamamlanana kadar patolojik ve sitolojik değerlendirme sonuçları yalnızca klinisyen araştırmacı tarafından bilindi, projenin AgNOR parametresi değerlendirmelerinde görev alan araştırmacılara bu konuda bilgi verilmedi. Her bir parametrenin elde edilmesi için yapılan analizi baştan sona aynı araştırmacı gerçekleştirdi. Böylece, özellikle ölçümlerde meydana gelebilecek el hassasiyeti farkı en aza indirilmeye çalışıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek kontrol ve malin hücreler her bir AgNOR parametresi için karşılaştırıldı ve bu değerlerin prognoz ile ilişkisinin olup olmadığı tespit edildi.

İstatistik: İstatistiksel analiz için ***SPSS programı (sürüm:15.0)*** kullanıldı. Veriler ortalama ±

Standart sapma olarak verildi. ***Bayesian statistics, based on receiver operating characteristic (ROC)-derived cutoff*** değerleri ayırıcı tanı amaçlı cutoff değerlerini vermek için kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında ise ***students' t test*** kullanıldı.

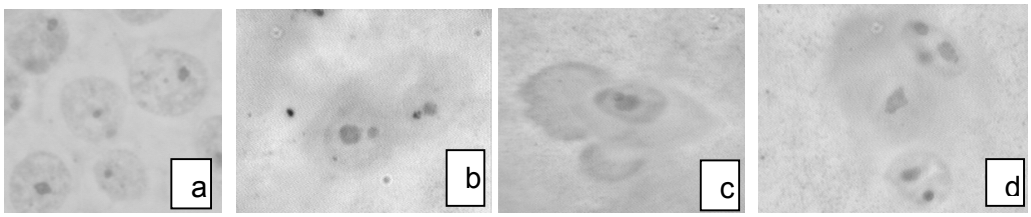
BULGULAR

Çalışmaya 11 kontrol (7 erkek ve 4 kadın), 24 mesane tümörlü birey (24 erkek) dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerin yaş ortalaması 60,94 ± 13,65 idi. Kontrol grubunun yaş ortalaması (55,546 ± 15,572) ile mesane tümörü tanısı almış grubun yaş ortalaması (63,417 ± 12,237) arasında anlamlı bir farklılık yoktu (p= 0,115). Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu bireylerin hem ortalama AgNOR sayısı (1,950 ± 0,535) hem de TAA/ÇA (4,373 ± 2,740) ile mesane tümörü tanısı almış hastaların ortalama AgNOR sayısı (3,06 ± 0,863) ve TAA/ÇA (11,450 ± 1,185) oranları arasında anlamlı derecede bir farklılık vardı (p = 0,000). Diğer taraftan kontrol grubu bireylerin ortalama AgNOR protein boyanma yoğunluğu (108,029 ± 7,330) ile mesane tümörü tanısı almış hastaların ortalama AgNOR protein boyanma yoğunluğu (112,500 ± 9,156) arasında ki fark anlamlı değildi (p = 0,135). Bunlara ilaveten kontrol grubu bireylerin ortalama AgNOR proteinlerinin kütleleri (544,143 ± 274,711), mesane tümörü tanısı almış hastaların ortalama AgNOR proteinlerinin kütlelerinden (1225,882 ± 433,289) anlamlı derecede düşüktü (p = 0,000) (Tablo 1). Proje çalışmamızda değerlendirilen hücreler arasından rastgele seçilen bir normal ve üç kanser hücresinin görüntüleri ise Şekil 1.'de verilmiştir.

Tablo 1: Mesane tümörü tanılı ve kontrol gruplarının AgNOR parametreleri.

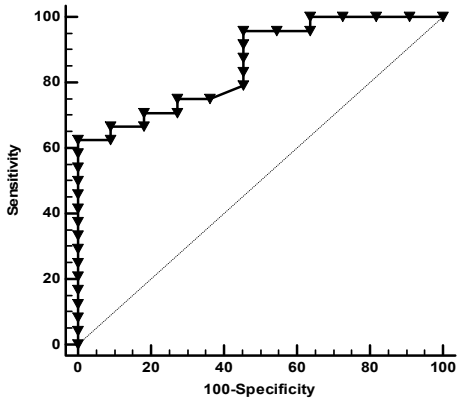
	AgNOR sayısı (Ort ± SS)	**TAA/ÇA Oranı (Ort ± SS)**	**AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu (Ort ± SS)**	**AgNOR proteinlerinin kütleleri (Ort ± SS)**
Kontrol Grubu	1,950 ± 0,535	4,373 ± 2,740	108,029 ± 7,330	112,500 ± 9,156
Hasta Grubu	3,06 ± 0,863	11,450 ± 1,185	544,143 ± 274,711	1225,882 ± 433,289
P Değeri	0,000	0,000	0,135	0,000

Ort: Ortalama **SS:** Standart Sapma



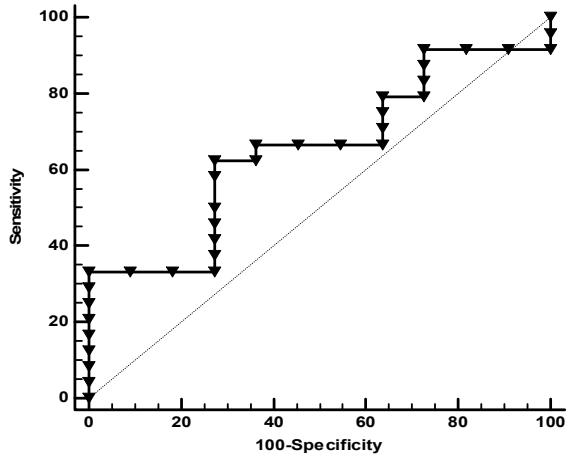
Şekil 1: Gümüş boyama uygulanmış normal (a) ve kanser (b-d) mesane hücrelerinde AgNOR proteinleri.

Ayırıcı tanı amaçlı yapılan Bayesian statistics, based on receiver operating characteristic (ROC)-derived cutoff istatistiği sonucu AgNOR sayısı için ilgili kriterion >2,73 ve AUC değeri 0,858 (p < 0,0001) (Şekil 2), AgNOR boyanma yoğunluğu için ilgili kriter >108,28 ve AUC değeri 0,652 (p = 0,120) (Şekil 3), AgNOR kütlesi için ilgili kriter > 526,52 ve AUC değeri 0,921 (p < 0,0001) (Şekil 4), TAA / TÇA oranı için ilgili kriter >6,4 ve AUC değeri 0,939 (p < 0,0001) (Şekil 5) bulunmuştur.



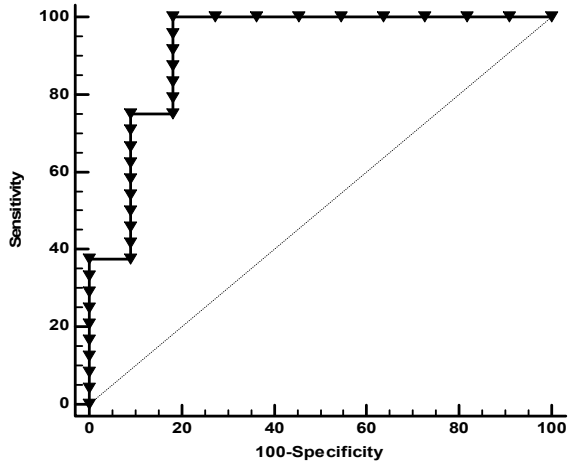
AUC : 0,858 **P<**0,000 **İlgili Kriter >** 2,73

Şekil 2: AgNOR sayısı için elde edilen ROC eğrisi



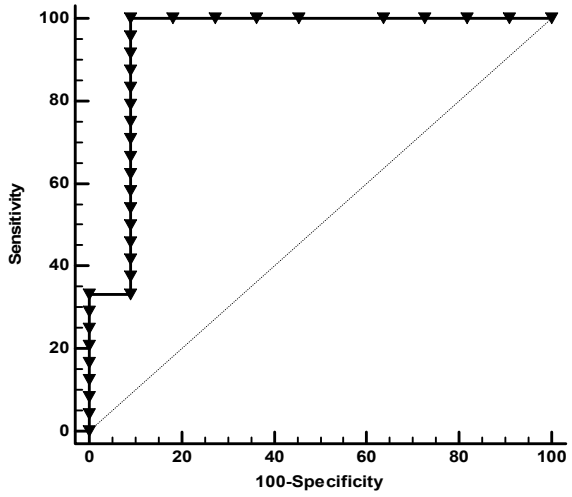
AUC : 0,652 **P :** 0,120 **İlgili kriter >** 108,28

Şekil 3: AgNOR boyanma yoğunluğu için elde edilen ROC eğrisi



AUC : 0,921 **P <** 0,0001 **İlgili kriter >** 526,52

Şekil 4: AgNOR kütlesi için elde edilen ROC eğrisi



AUC:0,939 **P** < 0,0001 **İlgili kriter** > 6,4

Şekil 5: TAA / TÇA değerleri için elde edilen ROC eğrisi

Tümör tanısı almış bireylerin 10 tanesi düşük dereceli değişici epitelyum karsinomu (DDDEK), 11 tanesi yüksek dereceli değişici epitelyum karsinomu (YDDEK), 1 tanesi yüksek dereceli invaziv değişici epitelyum karsinomu (YDİDEK), 1 tanesi insitü değişici epitelyum karsinomu (İDEK) ve 1 taneside düşük dereceli tranzisyonel hücre karsinomu (DDTHK) tanısı almıştır. Bu kanser alt grupları kendisi içerisinde değerlendirildiğinde, AgNOR sayısı, TAA/ÇA Oranı, AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu ve AgNOR proteinlerinin kütleleri açısından anlamlı derecede farklılıklar bulunmuştur. (p< 0,05) (Tablo 2).

Tablo 2: Kanser alt gruplarına göre AgNOR değerleri

	DDDEK (Ort ± SS)	**YDDEK (Ort ± SS)**	**YDİDEK (Ort ± SS)**	**İDEK (Ort ± SS)**	**DDTHK (Ort ± SS)**	**P Değeri**
AgNOR sayısı	2,672 ± 1,300	3,470 ± 1,578	3,070 ± 0,923	2,180 ± 0,873	2,960 ± 1,177	0,000
TAA/ÇA Oranı	11,503 ± 4,216	11,547 ± 4,723	10,211 ± 2,642	10,275 ± 3,824	12,423 ± 3,970	0,035
AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu	110,678 ± 13,089	113,773 ± 15,289	105,684 ± 5.326	109,980± 13,047	122,320 ± 8,292	0,000
AgNOR proteinlerinin kütleleri	1070,941±583,770	1399,607±1140,180	1094,518±403,232	773,516± 78,238	1026,877±437,678	0,000

DDDEK: Düşük dereceli değişici epitelyum karsinomu, **YDDEK:** Yüksek dereceli değişici epitelyum karsinomu
YDİDEK: Yüksek dereceli invaziv değişici epitelyum karsinomu, **İDEK:** İnsitü değişici epitelyum karsinomu
DDTHK: Düşük dereceli tranzisyonel hücre karsinomu, **Ort:** Ortalama, **SS:** Standart Sapma

Sitoloji laboratuarı sonuçlarına göre elde edilen grade'ler açısından karşılaştırma yaptığımızda, class 1 ve class 5' in AgNOR boyanma yoğunlukları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken (p= 0,038), bu classlar arasındaki ortalama AgNOR protein sayıları arasındaki fark anlamlıya yakındı (p=0,057). Yine AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu açısından class 1 ve class 2 arasındaki fark da anlamlıya yakındı (p= 0,054).

TARTIŞMA VE SONUÇ

NOR'lar ribozomal genleri içeren kromozomal segmentlerdir. NOR'lar aynı zamanda gümüş iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip olması nedeniyle, sitolojik ve histolojik örneklerde gümüş boyama metodu ile seçici olarak görülebilirler (Howell WM 1982). Bu yöntem kullanılarak yapılmış çeşitli çalışmalar vardır (Cucer N et al. 2007, Eroz R et al. 2011, Eroz R et al. 2010, Eroz R et al. 2011, Eroz R et al. 2012, Eroz R, Unluhizarcı K et al. 2012, Eroz R, Tasdemir S, et al. 2012). AgNOR sayısı ve hücre proliferasyonu arasındaki korelasyon tümör hücrelerinde geniş bir şekilde incelenmiştir (Cucer N et al. 2007, Eroz R et al. 2011, Pich A, et al. 2004, Eroz R et al. 2013). Bu nedenle AgNOR parametresi hücrelerin neoplastik doğasını yansıtabilir ve tümör patolojisinde önemli bir prognostik belirteç olarak karşımıza çıkar (Pich A et al. 2004, Jones AS et al. 1994, Underwood JCE 1995). AgNOR parametrelerinin hesaplanması (sayı, büyüklük ve dağılım) tümör patolojisinde hem prognostik hemde tanı amacıyla kullanılır. Çekirdek içerisindeki AgNOR sayı ve dağılımı mesane, böbrek, yutak, tiroid kanseri, deri melanositik lezyonları ve çoklu miyeloma gibi bazı neoplazilerin prognozu ve tanısında kullanılmaktadır (Cucer N et al. 2007, Eroz R et al. 2010, Eroz R et al. 2011, Pich A et al. 1995, Eroz R et al. 2013). AgNOR düzeylerinde görülen değişiklikler aynı zamanda protein sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. AgNOR proteinlerinin sayı ve hacmindeki artışların hücre çoğalması, farklılaşma vb. hücre aktivitisindeki artış ile ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Eroz R et al. 2011, Hall P et al. 1988, Jan Mohamed M et al. 1989). AgNOR proteinleri hücre çoğalmasına ilaveten, hücre metabolizması ile de ilişkilidir (Dayan D et al. 2002).

AgNOR boyama tekniğinin benign ve malign lezyonları ayırmak için patolojik materyaller üzerindeki neoplastik lezyonların büyük çoğunluğuna başarılı bir şekilde uygulandığı bilinmektedir (Ploton D et al. 1992, Rüschoff J 1992). Fakat bildiğimiz kadarıyla idrardan elde edilen mesane hücrelerinde AgNOR miktarının tespit edildiği bir çalışmaya rastlayamadık. Bu

nedenle, çalışmamızda mesane tümörü şüphesi taşıyan hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin idrarlarından elde edilen mesane hücrelerindeki ortalama AgNOR sayısı ve ‘‘TAA / ÇA’’oranları arasında bir fark olup olmadığını ve aynı zamanda bu AgNOR değerleri ile prognoz arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada mesane tümörü tanısı almış bireylerin mesane dokularından kesit alınarak elde edilmiş hücrelerdeki AgNOR değerlerinin kontrol bireylerinden elde edilenlere göre anlamlı derecede fazla olduğunu tespit ettik (Cucer N et al. 2007). Şu anki çalışmada da AgNOR sayısı, AgNOR kütlesi ve TAA / ÇA oranlarının malign ve benign lezyonlarında anlamlı derecede farklı olduğunu ve bu değerlerin mesane tümörü tanısı almış bireylerde oldukça önemli bir derecede arttığı gözükmektedir.

Yine şu anki yöntemi kullanarak önceden yapmış olduğumuz çalışmalarda, tiroid papiller karsinom ve normal tiroid hücre çekirdeklerinde hem ortalama AgNOR sayısının hemde TAA/ÇA değerlendirdik ve kanser gurubunda her iki AgNOR değerinin normal tiroid hücrelerindekinden anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik (Eroz R et al. 2010, Eroz R et al. 2011). Bunlara ilaveten, malign ve benign lezyonları ayırmak için AgNOR sayısı ve ‘‘TAA / ÇA’’oranları için cutoff değerleri tanımladık ve bu metodun malign ve benign tiroid lezyonlarındaki hücrelerin proliferasyon aktivitesini değerlendirmek için güvenilir bir metod olduğunu ve rutin sitopatolojiye katkı sağlayabileceğini tespit ettik ((Eroz R et al. 2011)).

Bu nedenle mesane tümörlülerden ameliyat öncesi alınan idrardan döküntü hücrelerden yararlanarak ayırıcı tanı yapabilmek amacıyla da sunduğumuz çalışmada AgNOR parametrelerinin her biri için cutoff değerleri tanımladık. Yaptığımız çalışma sonucu benign ve malign lezyonların ayırıcı tanısı için yalnızca AgNOR yoğunluğu hariç diğer AgNOR (AgNOR sayısı, AgNOR kütlesi ve TAA / ÇA) değerleri için anlamlı cutoff değerleri elde ettik (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4).

Daha önce AgNOR yöntemi kullanılarak yapılmış olan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır

(Denton TE et al. 1981, Das BC et al. 1986, Buys CH et al. 1979, Pedrazzini E et al. 1998, Thomas S and Mukherjee AB 1996, Camargo RS et al. 2006, Slowinska-Klencka D et al. 2004). Bu yöntemlerle kıyaslandığında bizim kullandığımız yöntemin, diğer yöntemlerden üstün yönleri bulunmaktadır. Yöntemimiz de ‘‘TAA / ÇA’’oranının her bir hücre için ayrı ayrı ölçümü, her bir hücrenin NOR protein sentez kapasitesinin tespit edilmesine izin verir. Bilindiği gibi hücrenin metabolik aktivitesine bağlı olarak yalnızca üretilen biyomoleküllerin miktarı değil aynı zamanda hücre ve çekirdeğin hacminde de değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle, ‘‘TAA / ÇA’’oranının tespiti ile her bir hücrenin proliferasyon kapasitesi hakkında daha net bilgiler elde edilmiş olur. Bu nedenle kullandığımız yöntemin malign ve benign lezyonlarını ayırmadaki başarı oranı daha yüksektir. Bu yöntemin uygulamasının basit ve ucuz oluşu ise yöntemin diğer avantajlarındandır**.**

Yaptığımız çalışma sonucu kanser alt grupları kendisi içerisinde değerlendirildiğinde, AgNOR değerlerinin her biri için (AgNOR sayısı, TAA/ÇA Oranı, AgNOR proteinlerinin boyanma yoğunluğu ve AgNOR proteinlerinin kütleleri) anlamlı derecede farklılıklar bulunmuştur (Tablo 2). Sitoloji sonuçlarına göre elde edilen grade’ler açısından karşılaştırma yaptığımızda, yalnızca class 1 ve class 5’ in AgNOR boyanma yoğunlukları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Esasen projemizin amacı da bu istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlı farklılıklar bulabilme beklentisiydi.

Sonuç olarak mesane tümörü şüphesi taşıyan bireylerin ameliyat öncesi mesane tümörü olup olmadığının tespiti için idrardan elde edilen hücrelere AgNOR boyama yöntemi kullanılarak bu değerlerin hesaplanmasının rutin sitopatolojide kullanılabileceği görülmektedir. Böylece gereksiz zaman, para kaybının önüne geçilebileceği gibi hastalara ilave girişimler olmadan da lezyon hakkında bilgiler elde edilebilecektir. Kısaca proje çalışmamızın hedeflerine ulaşmış bulunmaktayız. Bu raporda verilen bulgu ve değerlendirmeler, henüz yayınlanmadığı için sınırlı tutulmuştur. Makale hazırlama aşamasında daha çok ayrıntıya yer verilmektedir.

KAYNAKLAR

Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. World Journal Urol, 0383-3, 2009.

Modlich O, Prisack H-B, Pitschke et al. Identifying superficial, muscle-invasive, and metastasizing transitional cell carcinoma of the bladder: use of cDNA array analysis of gene expression profiles. Clin. Cancer Res. 10, 3410-3421, 2004.

Raman JD, Boorjian SA, Vaughan ED, et al. Bladder cancer after managing upper urinary tract transitional cell carclnoma: predictive factors and pathology. BJU Int.96, 1031-1035, 2005.

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al. Prognostic markers in bladder cancer. A contemporary review of the literature. J. Urol. 160,615-659, 1998.

Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, et al. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. JMIC. 1025 1-6, 2007.

Shiina H, Knuhel R, Hofstadter F. Evaluation of the argyrophilic nucleolar organizer region, nuclear DNA content and mean nuclear area in transitional cell carcinoma of bladder using a quantitative image analyzer. Eur. Urol. 29. 99-105, 1996.

Goodman MT, Yoshizawa CN, Kolonel LN. Descriptive epidemiology of thyroid cancer in Hawaii. Cancer. 61: 1272-1276, 1988.

Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions(NORs). In The Cell Nucleus. Eleventh volume. Edited by H Busvh, L Rothblum. New York, Academic Pres, pp 89-142, 1982.

Trere, D., AgNOR staining and quantification, Micron, 31, 127-131, 2000.

Bukhari MH, Niazi S, Hashmi I, et al. Use of AgNOR index in grading and differential diagnosis of astrocytic lesions of brain, Pak. J. Med. Sci, 23(2), 206–210, 2007.

Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, et al. Chemopreventetion of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. Oncol. Rep. 15(3), 533-538, 2006.

Han M, Shoenberg M. The use of molecular diagnostics in bladder cancer. Urol. Oncol. 5, 87-92, 2000.

Eroz R, Cucer N, Unluhizarcı K, Ozturk F. Detection And Comparison Of Cutoff Values For Total AgNOR Area/ Nuclear Area And AgNOR Number/Nucleus In Benign Thyroid Nodules And Normal Thyroid Tissue, Cell Biology International, 257-261, 2013.

Ploton D et al. Semiautomatic Quantification of Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions in Tissue Section and Cellular Smears. The International academy of Cytology Analytical and quantitative Cytology and Histology, v.14, n.1.1992.

Crocker J, McCartney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodkin's lymphomas. JPathol 154: 151-156,1988.

Devran PA, Gilmartin LG, Loftus BM, Carney DN Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. Am J Clin Pathol 92: 401-407, 1989.

Bostock DE, Crocker J, Haris K, Smith P. Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. Br J Cancer 59: 915-918,1989

Canepa M, Gambini C, Sementa AR, Borgiani L, Rovida S.Nucleolar organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study. Pathologica 82:125-32, 1990.
Soomro IN, Whimister WF. Growth fraction in lung tumors determined by Ki-67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. J Pathol 162:217–22, 1990.

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. 66B:36–39, 2005.
Cucer N, Imamoglu N, Tozak H, Demirtas H, Sarac F, Tatlisen A, Ozturk F. Two-dimensional agnor evaluation as a prognostic variable in urinary bladder carcinoma: A different approach via total agnor area/nucleus area per cell. Micron 38.674–679, 2007.

Eroz R, Cucer N, Karaca Z, Unluhizarci K, Ozturk F. The Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizing Region Proteins in Fine-Needle Aspiration Samples of Thyroid, Endocr. Pathol. 22.74–78, 2011.

Eroz R, Cucer N, Unluhizarci K, Ozturk F. Evaluation of AgNOR spot number in thyroid papillary carcinoma and normal cells nuclei. Journal of Health Sciences. 19(2):102-107, 2010.
Eroz R, Okur M, Berik O. Down sendromlu çocuklarda AgNOR sayısı ile gelişim arasında bir ilişki var mı? Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 1(1):8-11, 2011.

Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berik O, Gunes C. Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants? Genetic Counseling 23(2):249-253, 2012.

Eroz R, Unluhizarcı K, Cucer N, Baltaci D, Oktay M. Kistik Nodüler Guatrlı Olguların Tiroid Hücrelerindeki AgNOR Sayısı ve AgNOR Yüzey Alanı/Çekirdek Alanı Oranının Yaş ve Cinsiyete göre Karşılaştırılması Konuralp Tıp Dergisi 4(2):31-35, 2012.

Eroz R, Tasdemir S, Dogan H. Is there any relationship between decreased AgNOR protein synthesis and human hair loosing? Biotechnic & Histochemistry Early Online:1–5, 2012.

Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. Cancer Detect Prev 19:282-91, 1995.

Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem. J. 18:5–14, 1986.

Derenzini M. The AgNORs. Micron 31:117–120, 2000.

Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Pardo HG, Gomez M, Martin FR., Alonso MJ, Arias JL. Hippocampal AgNOR activity after chronic alcohol consumption and alcohol deprivation in rats. Physiol. Behav. 72:115–121, 2001.

Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. New insights into nucleolar architecture and activity. Int. Rev. Cytol. 255:177–235, 2006.

Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. Histochem. Cell Biol. 129:13–31, 2008.

Hayashida M, Miyaoka T, Tsuchie K, Yasuda H, Wake R, Nishida, A, Inagaki T, Toga T, Nagami H, Oda T, Horiguchi J. Hyperbilirubinemia- related behavioral and neuropathological changes in rats: a nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. Anal. Quant. Cytol. Histol. 14:14–23, 2009.

Ploton D, Visseaux-Coletto B, Canellas J-C, Bourzat C, Adnet JJ, Lechki C, Bonnet N. Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. Anal Quant Cytol Histol 14(1):14- 23,1992.

Rüschoff J. Nucleolar organizer regions in pathomorphologic tumor diagnosis. Veroff Pathol 139: 1-144, 1992.

Eroz R, Okur M, Berik O. Down sendromlu çocuklarda AgNOR sayısı ile gelişim arasında bir ilişki var mı? Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 1(1):8-11, 2011.

Eroz R, Okur M, Ozkan A, Berik O, Gunes C. Does higher NORs expression affect the developmental stages of down syndrome infants? Genetic Counseling 23(2):249-253, 2012.
Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. Cancer Detect Prev 19:282-91, 1995.

Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: Busch, H., Rothblum, L. (Eds.). The Cell Nucleus, Academic Press, New York, pp. 89–143, 1982.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumours. Annals of Oncology 15:1319-1329, 2004.

Jones AS, Roland NJ, Caslin AW, Cooke TG, Cooke LD, Foster G. A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell Carcinoma of head and neck. J Laryngol Otol108:859-64, 1994.
Underwood JCE. AgNOR measurements as indices of proliferation, ploidy and prognosis. J Clin Pathol: Mol Pathol 48 M:239-40, 1995.

Hall P, Crocker J, Watts A, Stansfeld A. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in non Hodgkin' s lymphoma. Histopathology 12:373-381, 1988.

Jan Mohamed M, Armstrong J, Crocker J, Leyland J, Hulten M. The relationship between number of interphase NOR and NOR bearing chromosomes in non Hodgkin's lymphoma. J Pathol. 158 (1): 3-7, 1989.

Denton TE, Liem SL, Cheng KM, Barrett JV. The relationship between aging and ribosomal gene activity in humans as evidenced by silver staining. Mech. Ageing Dev. 15 (1):1–7,1981.

Das BC, Rani R, Mitra AB, Luthra UK. The number of silverstaining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. Mech. Ageing Dev. 36 (2):117–123, 1986.

Buys CH, Osinga J, Anders GJ. Age-dependent variability of ribosomal RNA–gene activity in man as determined from frequencies of silver staining nucleolus organizing regions on metaphase chromosomes of lymphocytes and fibroblasts. Mech. Ageing Dev. 11 (1):55–75, 1979.

Pedrazzini E, Mamaev N, Slavutsky I. Age related decrease of NOR activity in bone marrow metaphase chromosomes from healthy individuals. Mol. Pathol. 51(1): 39–42, 1998.

Thomas S, Mukherjee AB. A longitudinal study of human agerelated ribosomal RNA gene activity as detected by silver-stained NORs. Mech. Ageing Dev. 92(2–3):101–109,1996.

Camargo RS, Shirata NK, di Loreto C, Garcia EA, Castelo A, Longatto Filho A. Significance of AgNOR measurement in thyroid lesions. Analysis and Quantitaive Cytology and Histology 28:188-192, 2006.

Slowinska-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, & Levinski A. Multiparameter analysis of AgNOR in thyroid lesions: comparison with PCNA expression. Histol Histopathol 19:785-792, 2004.

Dayan D, Vered M, Sivor S, et al. Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. Exp. Gerontol. 37, 841–50, 2002.