

Tiroid tümörlerinde proliferere olan hücre nükleus antijeni (PCNA) ❖

Nezahat YILDIRIM*, İbrahim Hanifi ÖZERCAN**

* Elazığ Devlet Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı

** F.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Bu çalışmada tiroid tümörlerinde proliferatif aktivitenin gösterilmesi amacıyla Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen 47 adet tiroidektomi materyali çalışmaya alındı. Normal tiroid (9), nodüler guatr (11), folliküler adenom (7), papiller karsinom (16), folliküler karsinom (2) ve anaplastik karsinom (2)'a immünohistokimyasal olarak PCNA yöntemi uygulandı. Parafine gömülen dokulardan hazırlanan kesitler PCNA/cyclin monoklonal antikorları ile boyandı. Pozitif boyanan nüveler değerlendirmeye alındı ve yüzde olarak PCNA indeksleri hesaplandı. PCNA indeksleri normal tiroid dokusunda % 0.5, nodüler guatıda % 2.1, folliküler adenomda % 2.6, papiller karsinomda % 6.2, folliküler karsinomda % 15.7 ve anaplastik karsinomda % 32.2 olarak değerlendirildi. Sonuç olarak benign tiroid tümörleri ile malign tiroid tümörleri karşılaştırıldığında PCNA indeksinin malign tiroid tümörlerinde belirgin artmış olduğu tesbit edildi.

Anahtar Kelimeler: Tiroid tümörleri, PCNA, indeks.

SUMMARY

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in thyroid tumors

We have studied on 47 thyroidectomy material that were came to Fırat University Medical Faculty Department of Pathology for the determination of proliferative activity. PCNA method were applied, normal thyroid(9), adenomatous goiter(11), follicular adenoma(7), papillary carcinoma(16), follicular carcinoma(2) and anaplastic carcinoma(2). All cases paraffin sections stained PCNA/cyclin monoclonal antibody. Positive painted nuclei was evaluated and PCNA indices were calculated as percentage. PCNA indices were evaluated normal thyroid %0.5, adenomatous goiter %2.1, follicular adenoma %2.6, papillary carcinoma %6.2, follicular carcinoma %15.7 and anaplastic carcinoma %32.2. As a conclusion, thyroid carcinomas showed significantly increased numbers of PCNA positive cells when compared with benign thyroid tumors.

Key Words: Thyroid tumors, PCNA, index.

Benign tiroid tümörleri ile tiroid karsinomlarında tümörün proliferatif aktivitesi immünohistokimyasal bir yöntem olan PCNA uygulanarak gösterilmeye çalışıldı. Malign tümörlerde proliferasyon daha hızlıdır. Tümörlerdeki proliferatif aktivite mitoz sayımı, AgNOR değerinin tayini, DNA flow sitometri, timidin işaretleme, PCNA, Ki-67 gibi proliferasyonla ilişkili nükleer antijenlerin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi ile belirlenmektedir (1-5).

PCNA mol ağırlığı 36-kd olan nonhiston nükleer proteindir. DNA polimeraz delta'nın bir yardımcı faktörü olarak işlev görür. Hücre siklusu sırasında PCNA düzeyleri oynamalar göstermektedir. G1 fazının sonunda DNA sentezinden hemen önce giderek artan miktarlarda hücrelerde belirlemekte, S-fazı sırasında özellikle yükselmekte ve G2 fazının başında kaybolmaktadır (6).

Bu çalışmada benign tiroid tümörleri ile malign ti-

Haberleşme Adresi: Dr. Nezahat YILDIRIM, Üniversite Mah. Yahya Kemal Cd. Erkuş Apt. No: 6 Kat: 4/8 23200-ELAZIĞ

Geliş Tarihi : 24.01.2001

Yayına Kabul Tarihi : 22.02.2001

❖ Bu çalışma XIII. Ulusal Patoloji Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

roid tümörleri arasındaki PCNA değerleri karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 47 adet tiroidektomi materyali incelendi. 47 olgunun 9'u normal tiroid, 11'i nodüler guatr, 7'si folliküler adenom, 16'sı papiller karsinom, 2'si folliküler karsinom ve 2'si de anaplastik karsinom idi.

PCNA'nın ekspresyonunu göstermek için %10'luk formalinle tespitli parafin bloklarından elde edilen kesitler, jelatinle kaplanmış lam üzerine alındı. Alkol ve ksilolden geçirildikten sonra Streptavidin Biotin yöntemi (BioGenex Cat No AA000-5M) ile boyandı.

Tüm inkübasyonlar oda ısısında, nemli ve kapalı bir ortamda gerçekleştirildi. Yıkamalarda fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) kullanıldı. Negatif kontrol için mouse immunoglobulin (BioGenex HK 119-5M), Pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Daha sonra tüm kesitlere Mikrodalga (MW) uygulandı.

Gücü 980W olan Vestel Goldstar Mikrodalga (MW) fırını kullanıldı (Model No:ER-5053T). 150 ml'lik beher içine sitrat tampon solüsyonu konularak, preparatlar yerleştirildi. Bu beher, içinde buz ile soğutulmuş su bulunan 600 ml'lik ikinci bir beher içine konuldu. Işınlama % 100 güç kullanılarak 1 dakika süreyle altı defa uygulandı.

Oda ısısında primer antikor (Supersensitivite Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen 19A2 BioGenex AM 206-5M) solüsyonu dokuların üzerine örtecek şekilde damlatıldı ve 90 dakika inkübe edildi.

Daha sonra sırasıyla Link (Biotinylated Anti-Mouse immunoglobulin, BioGenex HK 335-5M) ile 20 dakika, Label (Alkalin Phospatase Conjugated Streptavidin, BioGenex HK 331-5K) ile 20 dakika, Kromojen (BioGenex HK 181-5K)-Substrat (BioGenex HK 180-5K) solüsyonu ile 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve gliserin jel ile kapatıldı.

PCNA pozitifliğinin değerlendirilmesi ve PCNA boyanma indeksinin sayımı x400 büyütme ile ışık mikroskopunda yapıldı. Granüler yada diffüz tüm nükleer boyanmalar boyanma şiddetindeki farklılıklara bakılmaksızın pozitif kabul edildi ve bu alanlarda 1000 hücre sayıldı.

İstatistiksel olarak olguların ikili karşılaştırmasında Mann-Whitney-U, çoklu karşılaştırmada Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı.

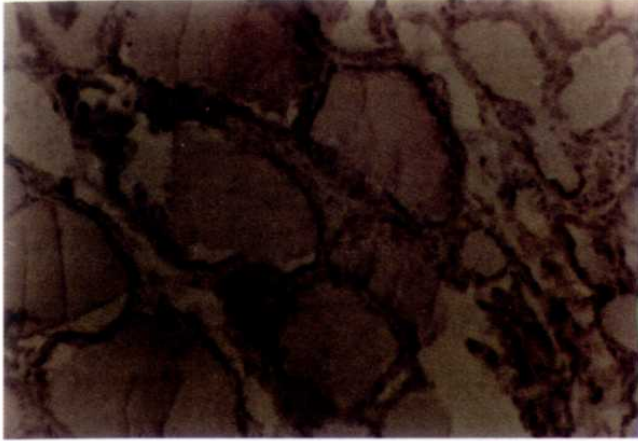
BULGULAR

Bu çalışmada 47 adet tiroidektomi materyali incelemeye alındı. 47 olgunun 9'u normal tiroid, 11'i nodüler guatr, 7'si folliküler adenom, 16'sı papiller karsinom, 2'si folliküler karsinom ve 2'si de anaplastik karsinomdu. PCNA indeksleri normal tiroid dokusunda % 0.5, nodüler guatrda % 2.1, folliküler adenomda % 2.6, papiller karsinomda % 6.2, folliküler karsinomda % 15.7 ve anaplastik karsinomda % 32.2 olarak bulundu. Olguların materyal, sayı ve PCNA indekslerine göre dağılımı tablo 1'de toplu halde sunulmuştur.

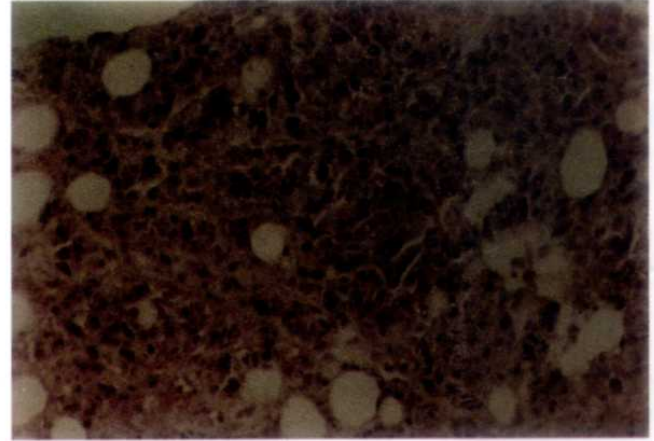
Tablo 1. PCNA pozitifliğinin materyal, sayı ve PCNA indekslerine göre dağılımı.

| MATERYAL | Olgu Sayısı | *PCNA İndeksi (% + min-max) |
|---------------------|-------------|-----------------------------|
| Normal tiroid | 9 | 0.5 + 0.2 (0.3-0.7) |
| Nodüler guatr | 11 | 2.1+ 0.6 (1.5-2.7) |
| Folliküler adenom | 7 | 2.6 + 0.7 (1.9-3.3) |
| Papiller karsinom | 16 | 6.2 + 1.9 (4.3-8.1) |
| Folliküler karsinom | 2 | 15.7 + 2.3 (13.4-18) |
| Anaplastik Karsinom | 2 | 32 + 3.7 (28.5-35.9) |
| TOPLAM | 47 | |

*PCNA indeksi 1000 hücredeki pozitif boyanan nüvelerin yüzdesi olarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. x200 büyütmede normal tiroid PCNA görüntüsü.



Şekil 2. x200 büyütmede anaplastik karsinom PCNA görüntüsü.

Nodüler guatr ve folliküler adenomlar benign tiroid lezyonları, papiller karsinom, folliküler karsinom ve anaplastik karsinomlar ise malign tiroid lezyonları olarak değerlendirildi.

Normal tiroid dokusu ve anaplastik karsinoma ait PCNA pozitifliğine ait boyanma görüntüleri şekil 1 ve şekil 2 de sunulmuştur. Anaplastik karsinomda normal tiroid dokusuna göre PCNA pozitifliğinin ne kadar ileri derecede olduğu ve koyu boyanma hemen dikkati çekmektedir.

Tiroid benign lezyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında PCNA indeksleri arasında önemli bir fark olmadığı görüldü. ($p > 0.05$)

Tiroid malign lezyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde aralarında istatistik olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi. ($p < 0.05$) İkili karşılaştırmalarda ise papiller karsinom-folliküler kar-

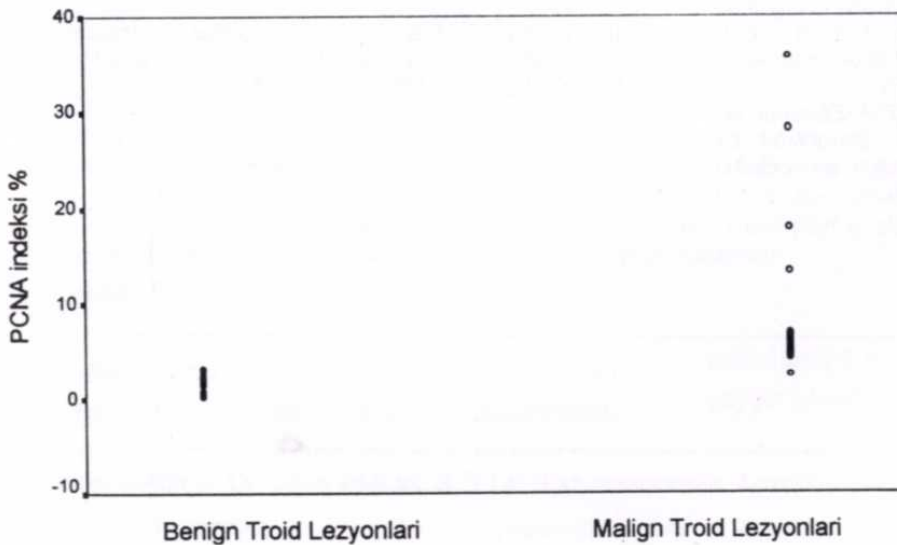
sinom, papiller karsinom-anaplastik karsinom ve folliküler karsinom-anaplastik karsinom grupları arasında farklılık saptandı. ($p < 0.05$)

Benign tiroid lezyonları malign tiroid lezyonları ile karşılaştırıldığında ise malign lezyonlarda benign tiroid lezyonlarına göre PCNA indekslerinin oldukça yüksek olduğu bulundu. ($p < 0.05$) Benign ve malign lezyonların değerlendirmesi sırasında olguların PCNA indekslerine göre dağılımını gösteren istatistiksel grafik şekil 3'te sunulmuştur.

TARTIŞMA

DNA polimeraz-delta yardımcı proteini olan PCNA ekspresyonunun gösterilmesi, malign potansiyel ile regeneratif aktivite hakkında değerli bilgiler vermektedir.

PCNA, Miyachi ve ark.(7) tarafından SLE'li hastaların serumlarında otoantikörler kullanılarak bu-



Şekil 3. Benign tiroid lezyonları ve malign tiroid lezyonlarına ait istatistiksel karşılaştırma grafiği.

lunmuştur. Siklin olarak da bilinen PCNA, proliferasyon hızı hücrelerde hücre siklusunun özellikle S fazında nüvede bulunan ve immunhistokimyasal yöntemlerle gösterilebilen bir proliferasyon belirleyicisidir(1,5). Sentez hızı hücrelerin proliferasyon hızı ile direkt korelasyon gösterir.

Tadahiro ve ark.(8) tiroid tümörlerinde proliferatif aktivite üzerine yaptıkları çalışmada normal tiroid, folliküler adenom, adenomatöz guatr, iyi diferansiye papiller karsinom, kötü diferansiye papiller karsinom, folliküler karsinom ve anaplastik karsinomda PCNA pozitif nüve oranlarını incelemişlerdir. Normal tiroid ile adenomatöz guatr ve folliküler adenom arasında PCNA pozitif nüve oranını anlamlı olarak bulmuşlardır. İyi diferansiye papiller karsinom ile kötü diferansiye papiller karsinom arasında PCNA indekslerinde fark bulamadıklarını ancak folliküler karsinomda papiller karsinomdan daha fazla, anaplastik karsinomda da folliküler karsinomdan daha fazla PCNA pozitifliği gözlediklerini bildirmişlerdir.

Chung ve ark.(9) yaptıkları çalışmada papiller karsinom, folliküler karsinom, medüller karsinom ve

anaplastik karsinomda PCNA indeksini incelemişler ve papiller karsinomdan anaplastik karsinoma doğru PCNA indeksinin arttığını saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda da normal tiroidden, nodüler guatr ve folliküler adenoma gidildikçe PCNA pozitif nüve oranında istatistiki olarak anlamlılık olmamasına rağmen hafif bir artış gözlenmiştir. Ancak malign tiroid lezyonlarından olan papiller karsinom, folliküler karsinom ve anaplastik karsinoma doğru gidildikçe PCNA pozitifliğinin giderek belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda folliküler karsinom ve anaplastik karsinom olgu sayılarının az olması istatistiki sonuçların tam sağlıklı olarak elde edilememesine yol açmış olabilir. Tiroid malign lezyonlarından özellikle anaplastik karsinom ve folliküler karsinoma seyrek rastlanması elimizde olmadan bu gruplardaki olgu sayısının düşük sayıda olmasına neden olmuştur.

Sonuç olarak benign tiroid tümörleri ile tiroid karsinomları karşılaştırıldığında tiroid karsinomlarında PCNA indeksinin oldukça yüksek oranda olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampolis J, Jothys. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:154-9.
2. Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984;309:374-6.
3. Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986;163:287-93.
4. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Rapid communication analysis of proliferative Grade using Anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989;134:733-9.
5. Ogata K, Ogata Y, Takasaki Y, Tan EM. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibody and murine monoclonal antibody. *J Immunol* 1987;139:2942-6.
6. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin(PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985; 4:655-61.
7. Miyachi K, Fritzer MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121:2228-34.
8. Shimizu-T, Usuda-N, Yamada-T, Sugeno-A, Iida-F. Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer* 1993;71(9):2807-12.
9. Xu-YJ. Proliferating cell nuclear antigen/cyclin (PCNA/cyclin) in thyroid carcinoma. *Chung-Hua-Wai-Ko-Tsa-Chih*. 1993;31(10):628-9.