



ARAŞTIRMA

NAZAL POLİPLERDEKİ EPİTELYAL HÜCRE PROLİFERASYONU İLE FİZİK MUAYENE BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. İlder TEZER¹, Dr. Arif ŞANLI², Dr. Burçin SARISOY², Dr. Deniz ŞEN¹,
Dr. Nagehan ÖZDEMİR BARIŞIK³

¹Erzincan Asker Hastanesi, KBB Hastalıkları Kliniği, Erzincan, Türkiye, ²Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi, KBB AD, İstanbul, Türkiye, ³Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji AD, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Nazal polipler kronik mukozal inflamasyon ile karakterize, multifaktöriyel kökenli nazal kavite içine doğru benign mukozal büyümelerdir. Nazal poliplerdeki, kronik inflamasyonla ilişkili epitelyal morfolojik değişiklikler (skuamöz metaplazi, sekretuar hiperplazi) epitelyal hücre proliferasyonundaki düzensizliği akla getirmektedir. Bu çalışmanın amacı nazal poliplerde mitotik aktivite oranları ile fizik muayene bulgularına göre hastalık yaygınlığının ortaya konması ve böylece immunohistokimyasal ve klinik karşılaştırılmanın yapılmasıdır. Yöntem ve gereçler: Nazal poliplerdeki epitelyal farklılaşma ve proliferasyonun büyüme faktörlerinin lokal salınımına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, 19 hastada Ki-67 monoklonal antikorları kullanarak nazal poliplerdeki hücre proliferasyonu değerlendirildi. Cerrahi öncesi hastalığın yaygınlığı Lund ve MacKay klasifikasyonuna göre belirlendi. Parametreler arası ilişkileri değerlendirmek için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Bulgu ve sonuçlar: Nazal polipozis evresi ve Ki-67 değerlendirmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamakla beraber, evre artıkça Ki-67 değerlerinin de artış gösterdiği izlendi ($p>0,05$).

Anahtar Sözcükler: Ki-67, nazal polip, immunohistokimya

COMPARISON OF EPITHELIAL CELL PROLIFERATION AND PHYSICAL EXAMINATION FINDINGS OF NASAL POLYPS

SUMMARY

Objective: Nasal polyps are benign mucosal protrusions into the nasal cavity which are multifactorial origin and characterized by chronic mucosal inflammation. In nasal polyps, chronic inflammation associated epithelial morphological changes (squamous metaplasia, secretory hyperplasia) suggest a dysregulation of epithelial cell proliferation. The aim of this study is to determine the disease extension in nasal polyps according to mitotic activity rates and physical examination findings and therefore to perform immunohistochemical and clinic comparison. In this study, any relation between the mitotic activity and grade scores of the nasal polyps was compared in order to find the extension of the disease. Materials and methods: The modifications of epithelial differentiation and proliferation observed in nasal polyps could be related to local secretion of growth factors. In 19 patients, we evaluated the cell proliferation in nasal polyps using Ki-67 monoclonal antibody immunohistochemically. Before surgery, clinical extent of disease was scored according to the classification of Lund and MacKay. Kruskal Wallis test was used for evaluation of the relationships between parameters. Conclusion and results: Although there was no statistically significance between Ki-67 and grade scores of the nasal polyps, there was an increasing tendency in Ki-67 scores while grade scores increases.

Keywords: Ki-67, nasal polyp, immunohistochemistry

GİRİŞ

Nazal polipler burun ve paranazal sinüslerin benign mukozal hastalıklarından biri olup etyolojileri ve tedavileri konusunda tartışmalar günümüzde devam etmektedir. Boyut ve yerleşimlerine göre başta burun tıkanıklıkları olmak üzere değişik semptom ve bulgulara neden olabilirler. Etmoid sinüslerin bir hastalığı olmasına rağmen, maksiller, sfenoid ve frontal sinüsler ventilasyon ve drenaj bozukluğu sonucu sıklıkla etkilenir¹.

Sekretuar hiperplazi ve skuamöz metaplazi gibi değişiklikler nazal poliplerde saptanmıştır. Bu bulgular nazal polipli hastaların epitelyal hücrelerinde morfolojik düzensizliklerin olduğunu göstermektedir².

Sitokinler, allerji, çevresel faktörler polip gelişiminde suçlanmasına rağmen etyoloji tam olarak saptanamamıştır. Enflamasyon ve hücresel proliferasyona neden olan olayların lamina propriadan kaynaklandığı düşünülmektedir³.

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini. Esas olarak G1, S, M ve G2 fazında görülür ve G0 fazında yoktur. Ki-67 proteini orijinal olarak ilk defa Gerdes ve arkadaşları tarafından bir kobayı Hodgkin lenfoma hücreleri ile immünize etmeleri sonucu 1983 yılında tarif edilmiştir. Bu yapı çoğalan bütün hücrelerde izlenmiş

İletişim kurulacak yazar: Dr. İlder TEZER, Erzincan Asker Hastanesi, KBB Hastalıkları Kliniği, Erzincan, Türkiye, E-mail: itezer76@yahoo.com

Gönderilme tarihi: 22 Mart 2006, revizyon gönderme tarihi : 24 Nisan 2006, yayın için kabul edilme tarihi: 6 Haziran 2006



ve araştırılan hücre popülasyonunun büyüyen bölümünü araştırmada kullanılan önemli bir marker olmuştur⁴. Ki-67 hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik aktivite ve tümör evrelemesinde sıklıkla kullanılmaktadır⁵.

Poliplerin yaygınlığının belirlenmesinde çeşitli evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Günümüzde en sık olarak kullanılanlardan biri Lund ve MacKay evreleme sistemidir. Bu evreleme sistemi radyolojik ve fizik muayene bulgularına göre düzenlenmiştir⁶. Tablo 1'de Lund ve MacKay evreleme sistemi gösterilmiştir.

Lund ve MacKay Sınıflaması	
Evre I	Orta meatusda lokalize polip dokusu alt konka üst sınırına ulaşmamış
Evre II	Alt konka üst-alt sınırı arasında
Evre III	Polip dokusu alt konkanın alt sınırını aşmış, nazal pasajı tamamına yakın tıkanmış

Tablo 1. Lund ve MacKay sınıflaması

Bu çalışmanın amacı nazal poliplerde Ki-67 proteini kullanılarak belirlenen mitotik aktivite oranları ile fizik muayene bulgularına göre hastalık yaygınlığının ortaya konması ve böylece immünohistokimyasal ve klinik karşılaştırılmanın yapılmasıdır.

HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışma Ocak 2004-Ocak 2005 tarihleri arasında, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. KBB servisinde, nazal polipozis nedeni ile ameliyat edilen toplam 19 olgu üzerinde yapıldı. Hastaların fizik muayene bulguları ameliyat öncesinde kaydedildi ve hastalığın yaygınlığına göre uygun cerrahi yöntemler uygulandı. Operasyon esnasında polip dokusundan patolojik inceleme için örnekler alınarak immünohistokimyasal boyama çalışması yapıldı.

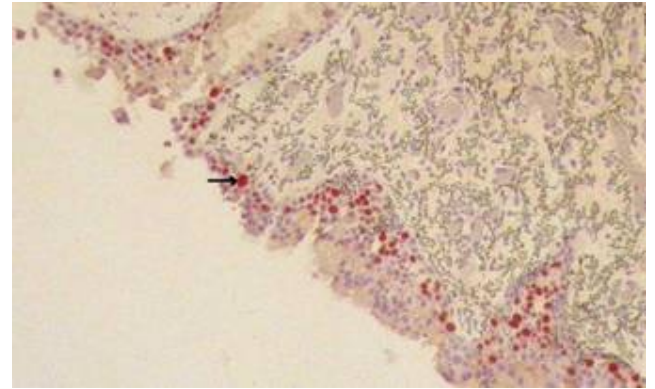
İmmünohistokimyasal boyama

Çalışmaya alınan olgularda Ki-67 oranını belirlemek amacı ile parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında hazırlanan kesitler 'Poly- L-Lysine' li lamlara alındı. Ki-67 (SP6) (Neomarkers, USA) için kullanıma hazır rabbit monoclonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

Etüvde bütün gece 37 °C' de bırakılan kesitler ertesi gün 60 °C' de 60 dakika bekletildi. Deparafinizasyon amacıyla üç kez beşer dakika ksilende ve iki kez onar dakika absölu alkolde bekletildikten sonra, rehidratasyon için bir dakika distile suda bekletildi. 1/10 oranında distile su ile sulandırılan antijen retrieval solüsyonu (sitrata buffer), önce mikrodalgada 750 wattta iki dakika, sonra 350 wattta otuz saniye inkübe edildikten sonra 15 dakika

boyunca beşer saniye aralar ile 160 wattta otuz saniye bekletildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler oda sıcaklığında yirmi dakika tutulduktan sonra distile su ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için, %3'lük hidrojen peroksit ile yirmi dakika inkübe edildi.

Kesitler distile su ile iki kez birer dakika yıkandı. Ki-67 monoklonal antikoru ile oda sıcaklığında 90 dakika bekletildi. PBS (phosphate buffer saline) ile üç kez beşer dakika yıkandıktan sonra HRP AEC yöntemi ile rutin boyama işlemi tamamlandı. Şekil 1'de polip dokusundaki Ki-67 ile boyanan hücreler görülmektedir.



Şekil 1. Polip dokusundaki Ki-67 ile boyanan hücreler (ok ile işaretli)

İmmünohistokimyasal değerlendirme

Ki-67 boyanan hücrelerin değerlendirilmesinde, Bujia ve arkadaşlarının yöntemi esas alındı⁷. Değerlendirmeye alınan lamlar üzerinde 400 büyük büyütme alanında 150 ile 500 hücre sayıldı. Ki-67 nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplandı.

Fizik muayenede hastalığın yaygınlığını değerlendirmek amacı ile Lund ve MacKay sınıflama sistemi kullanıldı.

İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma) ile normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. KBB servisinde, nazal polipozis tanısı ile ameliyat edilen toplam 19 hastanın 8'i erkek, 11'i



bayan idi. Yaşları 21-63 (yaş ortalaması 38) arasında değişmekteydi. Lund ve MacKay sınıflamasına göre evre I nazal polipozisi olan 7, evre II' de 5, evre III' de ise 7 hasta bulunmaktaydı. Tablo 2' de nazal polipozis derecesi ile Ki-67 ortalamaları ve şekil 2' de ise Ki-67 dağılımı görülmektedir.

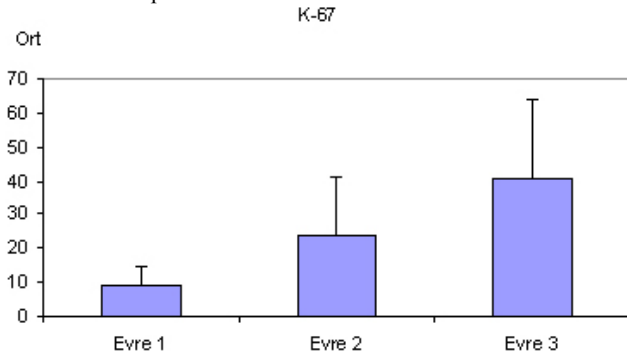
Evre	Ki-67 (Ort±SD)	p
Evre I	9,80±4,60	KW= 4,497 p= 0,116
Evre II	23,92±17,24	
Evre III	40,75±23,37	

Tablo 2. Ki-67 değerlerinin evrelere göre değerlendirilmesi

KW: Kruskal Wallis testi

Ort: Ortalama

SD: Standart sapma



Şekil 2. Evrelere göre Ki-67 dağılımı

Nazal polipozis derecesine göre Ki-67 değerlendirmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla beraber, evre arttıkça Ki-67 değerlerinin de artış gösterdiği izlenmiştir ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Nazal polipozis nazal mukozanın kronik enflamasyonu olup proliferasyona neden olan patolojik mekanizmalar günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda poliplerdeki epitelyal proliferasyonun alt konka mukozasına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Büyük olasılıkla lokal enflamasyonun oluşturduğu epitelyal hiperproliferasyon nazal polipozisin patogenezinde rol oynayabilir^{2, 8, 9}.

Nazal polipoziste, enflamatuvar reaksiyonlar epitelyal proliferasyonu uyaran bir etkiye sahiptir. Enflamatuvar hücrelerin epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve transforming growth faktör gibi büyüme faktörlerini üretme yeteneğine sahip oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{10, 11}. Benzer mekanizmalar kolesteatom içinde geçerlidir¹². Enflamatuvar reaksiyon sırasında bu faktörler enflamatuvar hücrelerden salgılanır ve bu da hücre proliferasyonunu artırıcı bir etkiye sahiptir.

Günümüzde klinik olarak Lund ve MacKay klasifikasyonu uygulanması preoperatif değerlendirmede önemli yer tutmaktadır. Hastalığın

yaygınlığının belirlenmesinde, bilgisayarlı tomografi ile birlikte sıklıkla kullanılmaktadır⁶.

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteindir. Esas olarak G1, S, M ve G2 fazında nükleer antijen ekspresyonu ile büyüme gösteren hücre fraksiyonunu gösterir. Bununla beraber G0 fazında yoktur. İnterfaz sırasında antijen çekirdek içinde saptanır, mitoz safhasında iken proteinin çoğu kromozomların yüzeyinde taşınırlar⁵. Ki-67 antikoru nazal polipozis gibi artmış proliferasyonun olduğu epitelyal hücrelerin saptanmasında kullanılabilen bir belirteçtir. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi şekilde gösteren bir protein olup, mitotik aktivite ve tümör evrelemede sıklıkla kullanılır¹³. Tryka ve arkadaşları (2005) nazal polipozis tanısı olan 30 hastalık çalışmalarında polip dokusunda Ki-67 değerini normal mukozaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır¹⁴. Hsu ve arkadaşları (2002) Ki-67 proteinini artmış epitelyal hücre proliferasyonunun göstergesi olarak kullanmışlar ve polip dokusunda normal mukozaya göre yüksek olarak bulunduğunu bildirmişlerdir⁸. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde monoklonal antikor olan Ki-67 proteini immünohistokimyasal olarak belirlenerek nazal polip hücrelerindeki artmış hücresel proliferasyonu saptamak amacı ile kullanıldı.

SONUÇ

Bu çalışmada Ki-67 protein ekspresyonu ile ölçülen proliferatif aktivitenin; hastalığın klinik olarak yaygınlığını ölçmede kullanılan evreleme sistemi karşılaştırılması yapılmıştır. Klinik olarak nazal polip yaygınlığı ile Ki-67 değerleri karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla beraber, evre arttıkça Ki-67 değerlerinin de artış gösterdiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Coste A, Rateau JG, Bernaudin JF, Peynegre R, Escudier E. Nasal polyposis pathogenesis: a flow cytometric and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation. *Acta Otolaryngol.* 1996 Sep;116:755-61. PMID: 8908256
2. Coste A, Rateau JG, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Gilain L, Poron F, Peynegre R, Bernaudin JF, Escudier E. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Apr;122:432-6. PMID: 8600930
3. Norlander T, Fukami M, Westrin KM, Stiern P, Carlsöö B. Formation of mucosal polyp in the nasal maxillary sinus cavities by infection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109:522-9. PMID: 8414573
4. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15;31:13-20. PMID: 6339421



5. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182:311-22. PMID: 10653597
6. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993; 31: 183-4 PMID: 8140385
7. Bujta J, Holly A, Sundhoff H, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Identification of proliferating keratinocytes in middle ear cholesteatoma using the monoclonal antibody Ki-67. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1996 Jan-Feb;58(1):23-6 PMID: 8718533
8. Hsu MC, Shun CT, Liu CM. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *J Formos Med Assoc.* 2002 Mar;101:227-9. PMID: 12051022
9. Hassid S, Degaute MP, Dawance S, Rombaut K, Nagy N, Choufani G, Decaestecker C, Danguy A, Salmon I, Kiss R. Determination of proliferative activity in nasal polyps. *J Clin Pathol.* 1997 Nov;50(11):923-8 PMID: 9462241
10. Petruson B, Hansson HA, Petruson K. Insulin-like growth factor I is a possible pathogenic mechanism in nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 1988; 106:156-60. PMID: 3421095
11. Elovic A, Wong DT, Weller PF, Matossian K, Galli SJ. Expression of transforming growth factors-alpha and beta 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J. Allergy Clin Immunol.* 1994 May;93:864-9. PMID: 8182229
12. Xu Y, Wu Z, Tao Z, Hua Q, Jin K. Possible role of transforming growth factor alpha on the cholesteatoma growth regulation *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2003 Jan;17:32-4. PMID: 12725186
13. Huisman MA, De Heer E, Grote JJ. Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol.* 2003 Apr;123:377-82. PMID: 12737294
14. Tryka E, Skomra D, Klatka J, Gieroba R, Olszanski W. Epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Otolaryngol Pol.* 2005;59(4):523-6. PMID:16273855