

BEYİN TÜMÖR HÜCRELERİNDE GLİAL FİBRİLER ASİDİK PROTEİN VE NÖROFİLAMENTLERİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEİN AND NEUROFILAMENTS IN BRAIN TUMORS

Berna Aksakal Yılmaz, Meral Sakızlı, M. Ali Özcel, Nezih Oktar, Eren Demirtaş

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji (BAY, MAÖ), Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji (MS), Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji (NO) ve Patoloji (ED) Anabilim Dalları, İzmir.

Türk Nöroşirürji Dergisi 4 : 231 - 235, 1992

ÖZET :

Çalışmamızda, çeşitli insan beyin tümörlerinden hazırlanmış hücre kültürlerinde, intermedyer filamentlerin değerlendirilmesi ile tümörlerin sınıflandırılması, tümörün "grade" ile ilgisinin belirlenmesi düşünülmüş ve böylece patolojik tanıya yardımcı olunması amaçlanmıştır.

Değerlendirme sonucunda, Glial fibriler asidik protein (GFAP) ve nörofilament (NF) için kontrol grubunda özgül olmayan boyanma görülmemiş, glial tümörler dışındaki çeşitli neoplazmlarda (nörinom, non-Hodgkin lenfoma, papiller adenokarsinom) negatif boyanma, çeşitli tipte glial tümörlerde ise belirgin pozitif boyanma saptanmıştır.

Çalışılan tümörlerde NF antikoruna karşı pozitif reaksiyon gözlenmemiştir.

Anahtar Sözcükler : *In vitro*, insan beyin tümörleri, Glial Fibriler asidik protein, nörofilament

SUMMARY :

In this study, the classification of tumors, determination of the relationship between a tumor and a "grade" on the cell culture, prepared from the various human brain tumors are planned and using these findings about intermediate filaments to assist the pathological diagnosis is aimed.

In conclusion, GFAP and NF nonspecific fluorescence staining was not seen on control group. Negative fluorescence staining was observed in various neoplasms (neurinoma, non-Hodgkin lenfoma, papillary adenocarcinoma) which were not glial tumors. Positive fluorescence staining was observed in various type of glial tumors.

Positive reaction against NF antibody was not seen on the tumors which are being examined.

Key Words : *In vitro*, human brain tumors, Glial fibrillary acidic protein, neurofilament.

GİRİŞ

Son yıllarda, hücre iskeleti elemanlarından İntermedyer Filamentlere (=IF) olan ilginin artmasında en önemli neden, bunların doku veya hücre tiplendirilmesinde kullanılabilecek birer işaretleyici (marker) olduklarının anlaşılmasıdır (2). Yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinin köken aldıkları hücre ile aynı IF tipine sahip olduklarını, metastazlarda da, orijin hücrede veya primer tümörde gözlenen IF tipinin bulunduğunu göstermektedir. (2,5,9).

Tümörleri, günümüzde, bilinen histolojik tekniklerle ulaşılamayan kesinlikte ayırmak için, IF'lere karşı antikorlar kullanılarak tümör hücre kökeni tanımlanabilmektedir. IF proteinlerine karşı oluşan antikorların, immünohistokimyasal yöntemlerle ve indirekt immünofluoresans tekniğiyle tümör ve metastazların saptanmasında kullanıldıkları bildirilmiştir (1,5,6,9).

Vimentin, desmin ve keratin filament monoklonal antikorları, nöronal ve glial orijinli olmayan (sarkom, adenokarsinom, rabdomiyom)

sarkom gibi) tümörlerin gelişimini saptamada sıklıkla kullanılırken, glial ve nöronal tümörlerin diagnostic çalışmaları için de anti-glial fibriller asidik protein ve anti-nörofilament monoklonal antikorlarının kullanıldığı bilinmektedir (6,7).

Başlangıçta, doku kültüründeki hücrelerde hücre iskeletine ait elemanların organizasyonu için başlanan bu çalışmalar, patologlar tarafından, farklı hücre tiplerinin direkt olarak ayırdedilebilmesini ve tiplendirilmesini sağlayan önemli bir yöntemin geliştirilmesine aracı olmuştur.

İntermedyer filamentlerin diferansiye ve indiferansiye tümörler arasında ayırımı sağladığı ve bu yolla hastalığın prognozu hakkında bilgi verdiği, tümör malignitesi ile immün boyanma yoğunluğu arasında da negatif bir korelasyon varlığı gösterilmiştir (1,3,4,12).

İn vitro hücre kültürü koşullarında yapılan bu çalışmada, insan santral sinir sistemi tümör hücreleri monoklonal antikorlar kullanılarak, glial filament ve nörofilament varlığı açısından, indirekt immüno floresans yöntemiyle taranmıştır. Çalışmamızda, intermedyer filamentlerin belirleyici özelliklerinden yararlanılarak, hücre tiplerinin ayırdedilmesi, tümörlerin sınıflandırılması, tümörün "grade" ile ilgisinin belirlenmesi ve böylece patolojik tanıya yardımcı olunması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışma sırasında, Ege Üniv. Tıp Fak. Nöroşirurji Anabilim Dalından sağlanan çeşitli beyin tümör dokularından hazırlanan hücre kültürleri ve Ege Üniv. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı Anabilim Dalından alınan deri biyopsisinden hazırlanan fibroblast kültürü kullanılmıştır. Tümörlerin patolojik sınıflandırma ve tanıları Ege Üniv. Tıp Fak. Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

Fragmant yöntemi ile hazırlanan hücreler, 25 cm² yüzeyli 50 ml hacimli hücre kültür kaplarında ve % 20 Fötal Dana Serum, 100 U/ml Penisilin 100 mcg/ml Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium 20mM Hepes tamponlu) içinde 37°C normal etüvde inkübe edilmiştir.

KULLANILAN SERUMLAR: Bu çalışmada, Monoklonal Anti-Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP) çalışma solusyonu 1:400, Monoklonal

Anti-Neurofilament 200 çalışma solusyonu 1:40 ve Anti-fare IgG (tüm molekül) FITC konjugat çalışma solusyonu 1:64 olarak PBS ile sulandırılmıştır.

IIF BOYAMA: İndirekt immüno floresans boyama, anti-GFAP, anti-NF serumları ile tüm tümör ve kontrol hücrelerin karşılaştırılması ile yapılmıştır. Anti-fare FITC konjuge serum (keçi) işaretleyici marker serum olarak kullanılmıştır.

SONUÇLAR

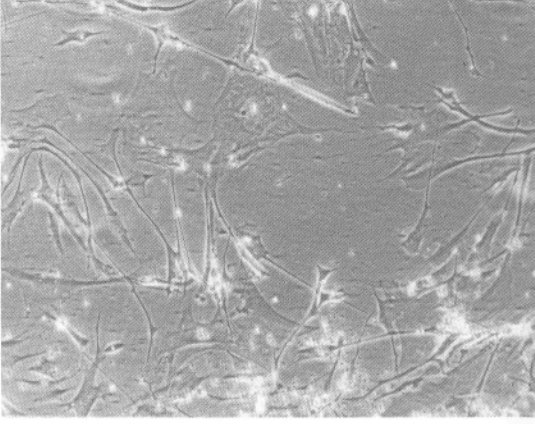
Glial filament ve nörofilamentlerin gösterilmesi için çalışmaya alınan 30 hastaya ait tümör dokusu anti-GFAP ve anti-NF monoklonal antikorları ile çalışılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Beyin Tümörlerinde anti-GFAP ve anti-NF monoklonal antikor çalışma sonuçlarının genel dökümü.

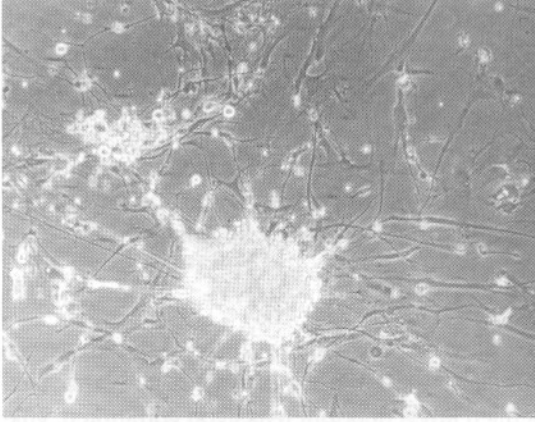
No	Hasta	C	Yaş	Patolojik tanı	GFAP	NF	PBS
1	MU	K	33	Astrositom G I-II	++	-	-
2	MT	K	35	Astrositom G I-II	++	-	-
3	AY	K	42	Astrositom G III	+ -	ç	-
4	MS	E	38	Astrositom G III	++	-	-
5	OM	E	35	Astrositom G III-IV	+ -	-	-
6	NÖ	E	46	Astrositom G III-IV	ç	-	-
7	OE	E	39	Astrositom G III-IV	+ -	-	-
8	ZY	K	40	Astrositom G IV	+ -	-	-
9	İK	E	64	Astrositom G IV	++	-	-
10	ÜT	K	5	Ependimom G III-IV	+ -	-	-
11	YG	K	12	Ependimom G III-IV	++	-	-
12	HS	E	27	Ependimom G III-IV	++	-	-
13	İY	E	45	Ependimom G III-IV	++	-	-
14	SÇ	E	8	Medüloblastom	++	-	-
15	AA	E	5	Medüloblastom	++	-	-
16	FA	K	21	Medüloblastom	++	-	-
17	NB	E	52	Glioblastoma multiforme	+ -	-	-
18	BÇ	E	65	Glioblastoma multiforme	++	-	-
19	NE	K	53	Glioblastoma multiforme	++	-	-
20	GE	K	38	Oligodendrogliom	++	-	-
21	HA	K	34	Oligodendrogliom	++	-	-
22	EŞ	K	50	Oligodendrogliom	+ -	-	-
23	AA	E	39	Gangliogliom G III	++	-	-
24	FY	E	56	Papiller adenokarsinom	-	ç	-
25	SA	K	15	Kavemom	+ -	-	-
26	MA	E	62	Karsinom metastazı	-	-	-
27	OÖ	E	59	Non-Hodgkin lenfoma	-	-	-
28	CB	E	24	Yuv.Hüc.Malign Tm.	+ -	-	-
29	İA	E	20	Pineoblastom	-	-	-
30	FK	K	70	Nörinom	-	-	-
Deri Fibroblast					-	-	-

GFAP = Glial Fibriller Asidik Protein, NF = Nöro Filament, PBS = Fosfat Tampon Solusyonu; (+ +) = Kuvvetli pozitif, (+ -) = Zayıf pozitif, (-) = Negatif, (ç) = Çalışmadı.

Hücre kültüründeki canlı hücrelerin fotoğrafları Olympus IMT-2 Inverted Phase-Contrast Mikroskopunda çekilmiştir (Şekil 1,2).

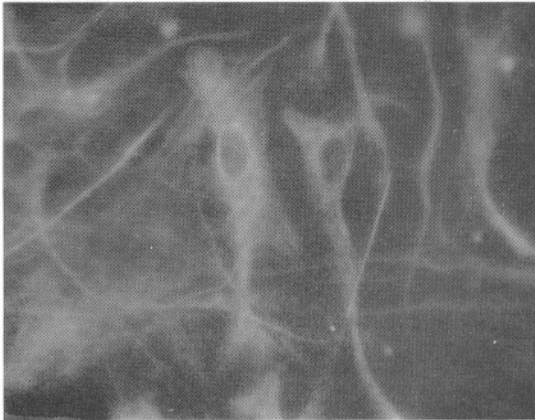


Şekil 1 : Glioblastoma multiforme hücreleri, 200x.



Şekil 2 : Medulloblastoma hücreleri, 200x.

Astrositom G I-II tanısı alan tümörde anti-GFAP antikoruyla kuvvetli pozitif reaksiyon veren hücreler gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 Astrocitom G I-II hücrelerinde GFAP'e karşı pozitif reaksiyon, 800x.

Astrositom G III'ten bir tanesi zayıf pozitif verirken diğeri kuvvetli pozitif reaksiyon vermiştir (Şekil 4).

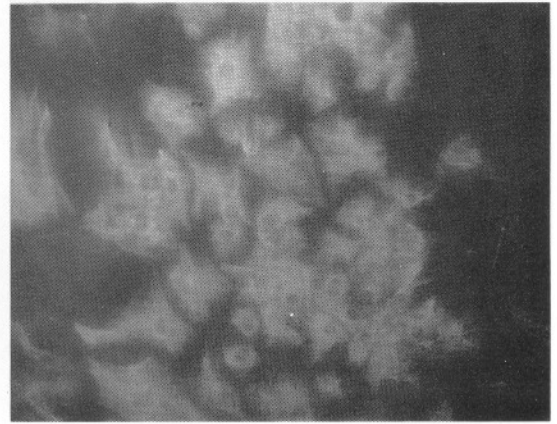


Şekil 4 : Astrositom G III'te GFAP'e karşı pozitif reaksiyon veren hücreler, 320x.

Üç tane astrositom G III-IV'ün bir tanesi çalışılmamış diğeri zayıf pozitiflik göstermiştir.

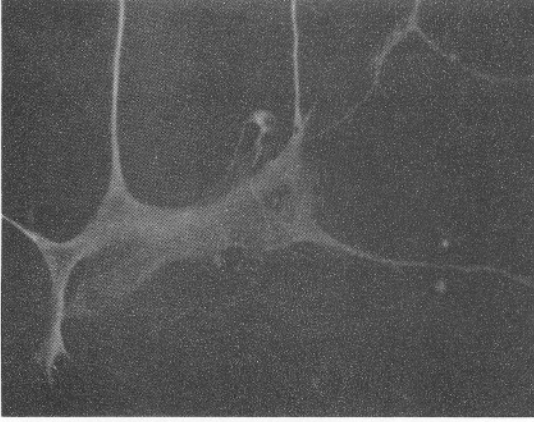
Astrositom G IV'ün bir tanesinde zayıf pozitiflik reaksiyon veren hücreler gözlenmiştir.

Dört tane Ependimom G III-IV'ün bir tanesinde daha az sayıda ve daha az yoğunlukta GFAP'e karşı pozitiflik veren hücreler görülürken diğerlerinde GFAP pozitif hücre sayısı ve yoğunluğu fazla olarak gözlenmiştir (Şekil 5).



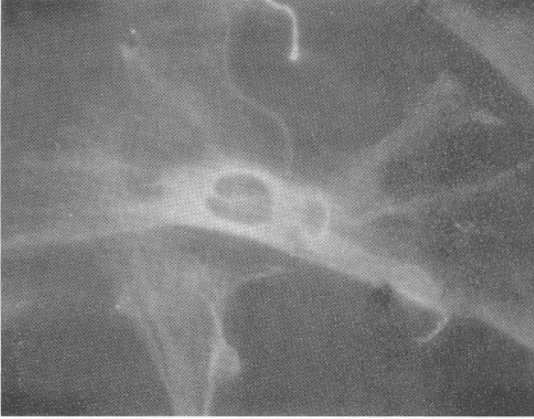
Şekil 5 : Ependimom G III-IV'te GFAP'a karşı kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren hücreler, 500x.

Çalışılan medulloblastomlarda GFAP açısından kuvvetli pozitiflik veren hücreler gözlenmiştir. (Şekil 6).



Şekil 6 : Medulloblastom hücrelerinde gözlenen pozitif reaksiyon, 320x.

Glioblastoma multiforme'nin bir tanesinde zayıf pozitiflik veren hücreler gözlenirken diğer iki tanesinde kuvvetli pozitiflik gösteren hücreler bulunmuştur (Şekil 7).

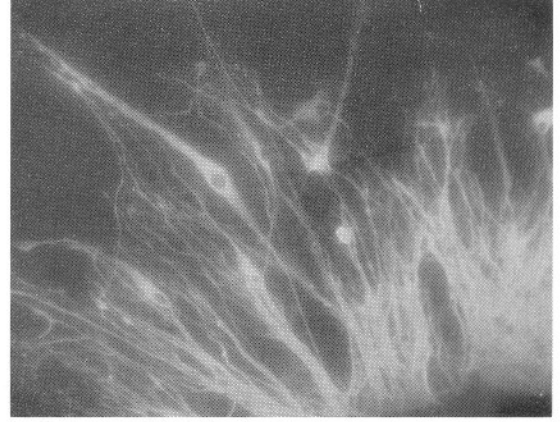


Şekil 7 : Glioblastoma multiforme'de GFAP açısından kuvvetli pozitiflik veren hücreler, 800x.

Oligodendrogliomlarda da aynı sonuç elde edilmiştir (Şekil 8).

Gangliogliom G III'te kuvvetli pozitiflik gösteren hücreler bulunurken, kavemomda zayıf pozitiflik veren hücreler gözlenmiştir. Sonuç olarak GFAP çalışılan 22 glial kökenli tümörlerin hepsinde (%100) olumlu sonuç alınmıştır.

Karşıt olarak, pineoblastom, nörinom, non-Hodgin lenfoma ve papiller adenokarsinomda negatif sonuçlar elde edilmiştir. Karsinom metastazı tanısı almış bir vakada ise, yer yer GFAP-pozitif hücreler görülmüştür. Non-glial



Şekil 8 : Oligodendrogliom hücrelerinde GFAP'e karşı görüle pozitif reaksiyon, 500x.

kökenli tümörlerin % 71,4'inde GFAP negatif bulunmuştur. GFAP değerlendirmesinde glial ve glial olmayan tümörlerin ayırımında istatistiksel olarak değeri anlamlı bulunmuştur. (Studentt test ile $p < 0.001$)

Bu tümörlerde nörofilament belirlenmesi amacıyla yapılan boyama sonucunda, tümünün negatif sonuç verdiği gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda düşük dereceli astrositomlarda indifferansiye özelliğe bağlı olarak beklenen kuvvetli pozitif reaksiyon görülürken, yüksek dereceli astrositomlarda zayıf pozitiflik gözlenmiştir. Bu sonuçlar, pozitif reaksiyonun yoğunluğu ile tümörün malignitesi arasında bir ilişki olduğunu gösteren immunohistokimyasal çalışmalarla paralellik göstermektedir (1,3,4,12). Ancak yüksek dereceli astrositomlardan iki tanesinde kuvvetli pozitif reaksiyon veren hücrelerin bulunması patolojik tanıyla farklılık göstermiştir.

Medulloblastomlarda ve oligodendrogliomlarda pozitiflik veren hücreler gözlenirken, bir oligodendrogliomda zayıf pozitiflik saptanmıştır. GFAP-pozitiflik açısından özellikle oligodendrogliomlar ve medulloblastomlar arasında farklılıklar olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından da gösterilmektedir (1,4,11,12).

Ependimom ve glioblastoma multiforme'de de zayıf ve kuvvetli pozitiflik görülmesi, bu konuda çalışan araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara uymaktadır (1).

Negatif sonuçları gözlediğimiz tümör tipleri, diğer araştırmacıların buldukları sonuçlarla birbirine uygunluk göstermektedir (1,4,10,12). Ancak bir karsinom metastazında negatif sonuç beklenirken çok az sayıda pozitif reaksiyon gösteren hücre bulunması, bu tümörde normal dokü hücreleri ile kontaminasyon olabileceğini düşündürmüştür. Bir pineoblastom olgusunda ise anti-GFAP antikorları ile negatif reaksiyon gözlenmiştir. Ancak olgu sayısı kısıtlı olduğundan pineoblastoma için genel bir kaniya varmak doğru değildir.

Glial farklılaşma potansiyeli olan hücrelerin bulunabileceği düşünülen kavernom ve yuvarlak hücreli malign tümör zayıf pozitiflik göstermiştir.

Anti-NF antikorları ile negatif sonuçların elde edilmesi, çalışılan tümörlerde nöronal kökenli hücre bulunmadığını göstermektedir. Nörofilament varlığı açısından bütün tümörlerde elde edilen negatif sonuçlar, daha daha önce yapılmış benzer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (8).

Çalışmada, özgül olmayan bir boyanma görülmeysi ve tekrarlanan boyamalarla hep aynı sonuçların elde edilmiş olması, yöntemin duyarlı ve doğrulukla tekrarlanabilir olduğunu kanıtlamıştır. Değerlendirmelerin hepsi, patolojik tanı esas alınarak yapılmıştır. Ancak, intermedyer filamentlerin immunolojik boyanmasının patolojide kullanılmakta olduğunu ve konvansiyonel patolojik yöntemlere destek olduğunu da göz ardı etmemek gerekir.

Yazışma Adresi: Doç. Dr. Nezih Oktar
Ege Üniversitesi Tıp Fak., Hast.,
Nöroşirürji Anabilim Dalı,
Bornova-35100, İZMİR

1. Chen, Y., Zhang, Y.: Use of Monoclonal Antibodies to Glial Fibrillary Acidic Protein in the Cytologic Diagnosis of Brain Tumor, *Acta Cytologica*, 33:922-928, 1989.
2. Czernobilsky, B., Lifschitz-Mercer, B., Luzon, A., et al.: Cytokeratin Patterns in the Epidermis of Human Ovarian Mature Cyctic Teratomas, *Human Pathology*, 20:185-192, 1989.
3. Denk, H., Krepler, R.: The Cytoskeleton in Pathologic Conditions, *Path. Res. Pract.*, 175:180-195, 1982.
4. Eng, L.F.: Brain-related Antigens, in Thomas, D.G.T., Graham, D.I. (ED): *Brain Tumours*: Butterworth and Co Ltd., 1980, pp. 109-114.
5. Gabbiani, G., Kapancı, Y., Barazzone, P., et al.: Immunohistochemical Identification of Intermediate-sized Filaments in Human Neoplastic cells.-A Diagnostic Aid for the Surgical Pathologist-, *Am. J. Pathol.*, 104:206-216, 1981.
6. Gown, A.M., Vogel, A.M.: Monoclonal Antibodies to Human Intermediate Filament Proteins, *Am. J. Clin. Pathol.*, 84:413-424, 1985.
7. Kovarik, J., Rejthar, A., Lauerova, L., et al.: Monoclonal Antibodies Against Individual Cytokeratins in the Detection of Metastatic Spread, *Int. J. Cancer: Supplement* 3: 50-55, 1988.
8. Osborn, M., Weber, K.: *Biology of Disease-Tumor Diagnosis by Intermediate Filament Typing: A Novel Tool for Surgical Pathology*, *Laboratory Investigation*, 48:372-394, 1983.
9. Ramaekers, F., Puts, J., Kant, A., et al.: Differential Diagnosis of Human Carcinomas, sarcomas and Their Metastases Using Antibodies to Intermediate-Sized Filaments, *Eur. J. Cancer Oncol.*, 18:1251-1257, 1982.
10. Tascos, N.A., Parr, J., Gonatas, N.: Immunocytochemical Study of the Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Neoplasms of the Central Nervous System, *Pathology*, 132:454-458, 1982.
11. Trojanowski, J., Lee, V.M-Y., Schlaepfer, W.W.: An Immunohistochemical Study of Human Central and Peripheral Nervous System. Tumors, Using Monoclonal Antibodies Against Neurofilaments and Glial Filaments, *Human Pathol.*, 15:248-257, 1984.
12. Velasco, M.E., Dahl, D., Doessmann, U., et al.: Immunohistochemical Localization of Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Glial Neoplasms, *Cancer*, 45:484-494, 1980.