● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هفتم، شمارهٔ ۴، پاییز۱۳۸۴، صفحه ۵۷-۵۳
دریافت: ۸۳/۹/۷، پذیرش: ۸۴/۲/۷

بررسی حساسیت و ویژگی Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) در تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی و دیسپلازی اپیتلیالی دهان

مریم سیدمجیدی [۱*]، اعظم صفات [۲]

۱- استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دندانپزشک عمومی

سابقه و هدف: امروزه برای تشخیص سرطان و ضایعات پیش سرطانی، علاوه بر رنگ‌آمیزی معمولی از انواع مارکرهای سلولی و روشهای ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شود که در شرایط کنونی به علت پرهزینه بودن اکثر این روشها باید به دنبال راههای تشخیصی ارزان‌تر و ساده‌تر مانند رنگ آمیزی نیترات نقره جهت بررسی نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای باشیم.

مواد و روشها: ۳۰ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ۳۰ مورد دیسپلازی مخاط دهان توسط نیترات نقره رنگ آمیزی شدند . نواحی سازمان دهنده‌ی هسته‌ای بر روی ۱۰۰ هسته به طور تصادفی و با بزرگنمایی ۱۰۰× شمارش گردید. ۳۰ مورد اپی تلیوم نرمال دهان از نواحی اطراف همان نمونه‌ها انتخاب شد.

یافته ها: میانگین تعداد نقاط در مخاط نرمال ۱/۵۴±۰/۲۲، در دیسپلازی۲/۴۶±۰/۵۱ و در کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی ۳/۳۴±۰/۶۷ بود. ارتباط آماری معنی‌داری میان گروههای مختلف وجود داشت(p=۰/۰۰۰). در بررسی حساسیت و ویژگی این نوع رنگ آمیزی در مورد اپی‌تلیوم نرمال دهان ارزش قابل توجهی دیده نشد. در مورد دیسپلازی دهان، حساسیت ۷۰٪ و ویژگی ۵۰٪ و در مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۷۵٪ بود.

نتیجه گیری: شمارش AgNORs، روشی مفید جهت افتراق کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، دیسپلازی اپیتلیالی و مخاط نرمال دهان می باشد. باتوجه به حساسیت و ویژگی بالای این روش در مورد SCC دهان، می‌توان از آن به عنوان یک روش کمکی قابل اعتماد در کنار روش‌های مرسوم سود جست.

واژه های کلیدی: *کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، دیسپلازی اپیتلیالی،اپی تلیوم نرمال دهان،نقاط سازمان دهنده هسته ای.*

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هفتم، شمارهٔ ۴، پاییز ۱۳۸۴، صفحه ۵۷-۵۳

مقدمه

شایعترین نئوپلاسم بدخیم دهان کارسینوم سلول سنگفرشی می‌باشد که حدود ۹۰ درصد از بدخیمی‌های این ناحیه را شامل می‌شود. از طرفی این ضایعه ۳ تا ۴ درصد از کل تومورهای بدخیم را در بدن انسان تشکیل می‌دهد. اکثر بیماران در محدوده‌ی سنی بالای ۴۵ سال قرار دارند(۱). با توجه به شیوع بالای این ضایعه در کشورهای آسیایی مجاور با کشور ما مانند افغانستان، پاکستان و هند به نظر می‌رسد که این عارضه در ایران نیز نسبت به کشورهای اروپایی شیوع قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. این کارسینوما در موارد زیادی می‌تواند بر روی ضایعات پیش سرطانی مخاط دهان ایجاد شود که این مسأله می‌تواند پاتولوژیست را در تعیین و تفکیک ضایعه پیش سرطانی از ضایعه سرطانی دچار مشکل سازد. در حال حاضر راه شناخت این ضایعه برداشتن نمونه و انجام آزمایشات

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.4.9.2]

هیستوپاتولوژیک با روش رنگ آمیزی H & E می‌باشد(۲و۱). برای به حداقل رساندن اشتباهات تشخیصی و بدست آوردن درجه بدخیمی، از انواع مارکرهای سلولی مانند سیتوکراتین نیز می‌توان استفاده کرد که به علت گرانی کیت‌های تشخیصی و عدم دسترسی آسان به آنها، در آزمایشگاههای پاتولوژی عملاً مورد استفاده قرار نمی‌گیرند.

برای تشخیص دقیقتر این ضایعات نوعی رنگ آمیزی بنام رنگ آمیزی نیترات نقره پیشنهاد شده است که جهت نشان دادن نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای Nucleolar Organizer (NORs) Regions بکار می‌رود. این نقاط (NORs) حلقه‌هایی از DNA سلول هستند که RNA ریبوزومی را کد می‌کنند(۳و۲). این حلقه‌ها طی مرحله اینترفاز، داخل هسته سلول جایگزین می‌شوند(۴). گفته می‌شود، تعداد این نقاط، با سرعت رونویسی RNA و میزان پرولیفراسیون سلول در ارتباط است(۵و۱).

مطالعه‌ی ضایعات مختلف مخاط دهان با این روش نشان داده است که ضایعات بدخیم نسبت به ضایعات خوش خیم دارای تعداد بیشتری از نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای می‌باشند(۶). به همین جهت تعداد AgNORs در مخاط دهان به عنوان شاخصی جهت افتراق، تشخیص و تعیین پیش آگهی در حالت نرمال، پیش سرطانی و سرطانی مورد توجه قرار گرفته است(۱۲-۷).

هدف از این مطالعه، تعیین تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در مخاط نرمال، ضایعات دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در بیماران مراجعه کننده به بخش پاتولوژی دهان و فک و صورت دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.

مواد و روشها

این مطالعه توصیفی – تحلیلی به روش مقطعی بر روی ۳۰ نمونه SCC دهانی از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی ۱۳/۸۱±۵۹/۱۲ و ۳۰ نمونه دیسپلازی مخاط دهان از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی۱۷/۷۲±۵۶/۱۷ که بین سالهای ۱۳۸۲-۷۵ به بخش پاتولوژی دهان و فک و صورت دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد.

این نمونه‌ها حاوی مخاط نرمال در کناره‌های خود بودند که از بین این‌ها، ۳۰ نمونه به عنوان مخاط نرمال انتخاب شد. بعد از تهیه برشهای ۵ میکرونی از بلوکهای پارافینه، نمونه‌ها با نیترات نقره براساس روش پیشنهادی ploton رنگ‌آمیزی شدند(۱۳). در مرحله‌ی آخر در هر اسلاید تعداد ۱۰۰ عدد هسته سلول به طور تصادفی با درشت نمایی۱۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند.

اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون آماری One Way ANOVA و نرم افزار کامپیوتری SPSS آنالیز شدند. برای بررسی حساسیت و ویژگی این روش رنگ آمیزی Roc Curve ترسیم شد.

یافته‌ها

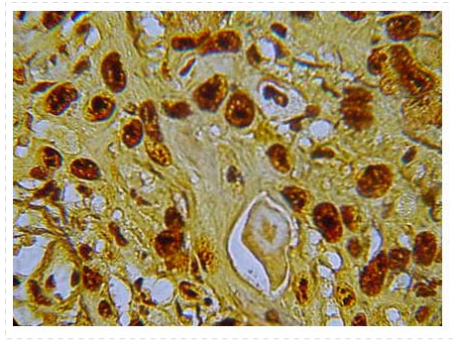
میانگین تعداد نقاط در مخاط نرمال ۱/۵۴±۰/۲۲، در دیسپلازی۲/۴۶±۰/۵۱ و در کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی ۳/۳۴±۰/۶۷ بود. ارتباط آماری معنی‌داری میان گروههای مختلف وجود داشت(p=۰/۰۰۰). تعداد نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای بین سه درجه‌ی تمایز SCC دهانی و سه درجه دیسپلازی تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد(p>۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در سه گروه مورد بررسی

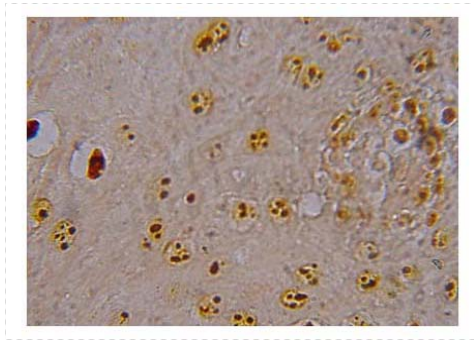
شاخص	تعداد نمونه	میانگین	انحراف معیار
مخاط نرمال دهان	۳۰	۱/۵۴۵۳	۰/۲۲۴۴۲
دیسپلازی مخاط دهان	۳۰	۲/۴۶۹۰	۰/۵۱۶۳۴
کارسینوم سلول سنگفرشی دهان	۳۰	۳/۳۴۵۰	۰/۶۷۴۲۳

نقاط یا نواحی سازمان دهنده‌ی هسته‌ای در مخاط نرمال کاملاً گرد و کوچک در داخل هسته دیده شدند در صورتی که در ضایعات دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، شکل این نقاط نظم خود را از دست داده بود و در اکثر نمونه‌های SCC دهان نقاط دارای اندازه‌ی کوچک بود و به طور پراکنده در کل هسته دیده شد(تصاویر ۱و۲).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.4.9.2]

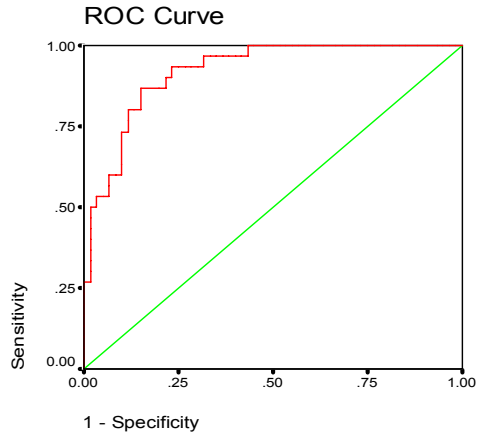


تصویر ۱. رنگ آمیزی نیترات نقره در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان



تصویر ۲. رنگ آمیزی نیترات نقره در دیسپلازی دهان

با استفاده از ROC Curve حساسیت و ویژگی این روش رنگ آمیزی در سه گروه مخاط نرمال، دیسپلازی و SCC دهان مورد بررسی قرار گرفت. در مخاط نرمال فاقد ارزش بود در گروه دیسپلازی دارای حساسیت ۷۰٪ و ویژگی حدود ۵۰ درصد و در SCC دهان، دارای حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۷۵٪ بود(نمودار ۱).



نمودار ۱. حساسیت و ویژگی رنگ آمیزی نیترات نقره در کارسینوم سنگفرشی دهان

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نسبت به بافت نرمال ۲/۲ برابر و نسبت به دیسپلازی ۱/۴ برابر افزایش داشت. اختلاف میان هر سه گروه توسط آنالیز آماری معنی‌دار تشخیص داده شد(p= ۰/۰۰۰).

در تحقیقات Schwint تعداد NOR در کارسینوما بیش از اپی‌تلیوم دیسپلاستیک و آن هم بیش از اپی‌تلیوم نرمال بود و رابطهٔ معنی‌داری در این خصوص بدست آمد(p=۰/۰۰۰۷) (۸) این نتایج در تحقیقات Kobayashi بر روی لکوپلاکیای بدون تغییرات دیسپلاستیک، دیسپلازی دهان و SCC مخاط دهان نیز حاصل شد(۱۴).

در مطالعهٔ اسلامی و همکارانش میانگین تعداد NOR در گروه سالم۰/۴۶±۲/۳۳، در گروه ضایعات پیش سرطانی (دیسپلازی) ۰/۷۸±۴/۶۳ و در ضایعات سرطانی(SCC) ۱/۸۹±۷/۵ عدد بود که میان هر سه گروه تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت(p<۰/۰۵). همچنین مشاهده گردید که این نقاط در مخاط نرمال کاملاً گرد و کوچک و در ضایعات دیسپلاستیک و سرطانی، شکل این نقاط نامنظم، اندازه‌ی آنها کوچکتر و با پراکندگی بیشتر در داخل هسته سلولها می باشد(۱۵).

Chattopadhyay جهت بررسی تعداد NOR در مخاط نرمال، لکوپلاکیا و SCC مطالعه‌ای انجام داد. او افزایش این نقاط را در لکوپلاکیا و SCC گزارش کرد. نکته جالب توجه در این تحقیق، کوچک و نامنظم شدن نقاط در ضایعات با دیسپلازی بیشتر نسبت به ضایعات با دیسپلازی کمتر بود(۳).

همچنین نقاط یا نواحی سازمان دهنده‌ی هسته‌ای در مخاط نرمال کاملاً گرد و منظم در داخل هسته‌ها دیده شدند، در صورتی که در ضایعات دیسپلاستیک و سرطانی، شکل این نقاط نظم خود را از دست داده بود و در اکثر نمونه‌های SCC دهان نقاط کوچک و به صورت پراکنده در هسته دیده شدند. از جمله تحقیقاتی که بررسی تعداد نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای را فاقد ارزش تشخیصی می‌داند، مطالعهٔ Beer بر روی تومورهای خوش خیم و بدخیم استرومال معده و روده می‌باشد. در این تحقیق اختلاف آماری

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.4.9.2]

معنی‌داری میان تعداد نقاط موجود در دو گروه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم مشاهده نشد(۱۶). البته از آنجا که در این تحقیق نوع تومور مشخص نشده است و نیز نمونه‌ها کم و نامتناسب بوده‌اند (۷ نمونه بدخیم در مقابل ۱۷ نمونه خوش خیم) نتایج قابل استناد نمی‌باشد.

در تحقیقات Arora نتیجه گیری شد که تعداد NOR با افزایش درجه‌ی بدخیمی یا کاهش تمایز در SCC سر و گردن افزایش یافته و اندازهٔ آنها کوچکتر و نامنظم‌تر می‌شود(۱۷) Migaldi نیز نتایج مشابهی را در میزان AgNOR در SCC بین grade I و grade III بدست آورد(۱۸).

Chatterjee نیز دریافت که تعداد AgNOR از SCC با تمایز خوب بسمتSCC با تمایز متوسط و SCC با تمایز ضعیف افزایش می‌یابد و رابطه‌ی آماری معنی‌داری نیز در این رابطه پیدا کرد($p<۰/۰۱$) (۶).

همچنین در تحقیقات Sulkowska ارتباط آماری معنی‌داری در شمارش AgNOR بین گروههای دیسپلازی خفیف و شدید بدست آمد(۱۹).

اما در تحقیق حاضر، در بررسی مقایسه‌ای شمارش AgNOR در بین سه درجه تمایز SCC دهان و سه درجه دیسپلازی ارتباط آماری معنی‌داری بدست نیامد($p>۰/۰۵$) که شاید به علت کمی نمونه و عدم تناسب تعداد نمونه‌های با درجه تمایز مختلف در SCC و با شدت‌های مختلف در دیسپلازی باشد. با استفاده از Roc curve حساسیت و ویژگی را در سه گروه بررسی کردیم. در مورد SCC این روش از حساسیت۹۰٪ و ویژگی ۷۵٪ برخوردار بود و می‌توان از آن به عنوان یک روش کمکی در کنار دیگر روش‌ها استفاده کرد.

در مجموع مطالعه‌ی حاضر استفاده از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره را به عنوان یک روش کمکی بسیار خوب در افتراق بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، دیسپلازی مخاط دهان و مخاط نرمال دهان پیشنهاد می‌کند.

البته تحقیقات بیشتر پیرامون استفاده از این روش در تشخیص سایر تومورها و سرطانهای انسانی توصیه می‌گردد. چرا که این روش ساده و عملی بوده و مواد لازم با هزینه اندکی قابل دسترسی می‌باشد، ضمن اینکه کاربرد آن در اکثر سرطانهای انسانی نتایج مفیدی را به دنبال داشته است.

تقدیر و تشکر

از کارکنان محترم بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در کلیه مراحل این تحقیق ما را یاری نموده‌اند، سپاسگزاریم.

****

References

1. Costa A, Arauja N, Pinto D, Araujo V. PCNA/ AgNOR and ki- 67/ AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1999; 28: 438-41.

2. Lelmini MV. AgNOR are sensitive markers of radiation in squamous epithelial lesions. J Dent Res 2000; 79(3): 850-6.

3. Chattopadhyay A, Chawda JG, Doshi JJ. Silver-binding nucleolar organizing regions: a study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg 1994; 23: 374–7.

4. Derenzini M, Pession A, Trere D. Quantity of nucleolar silver-staining proteins in related to proliferating activity in cancer cells. Lab Invest 1990; 63: 137-40.

5. Kinoshita Y, Dohi M, Mizutani N, Ikeda A. Effects of preoperative rediation and chemotherapy on AgNOR count in oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 1996; 54: 304–7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.4.9.2]

6. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty RN, Mitra RB. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in relation to human papillomavirus infection and cytokinetics. J Oral Pathol Med 1997; 26: 310–4.

7. Hara T. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in mucosal epithelium under experimental denture bases in rates. J Oral Pathol Med 2000; 29: 33–8.

8. Schwint AE . AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogensis. J Oral Pathol Med 1996; 25: 20–4.

9. Zheng M, Tian X, Li H, Cheng Y, Chen X. Expression Of PCNA and the count of AgNOR in squamous cell carcinoma in larynx and hypopharynx. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 2002; 16(12): 653-5.

10. Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts indiagnosing epithelial dysplasia. J Oral Pathol Med 2003; 32(2): 71–6.

11. Fabbrocini G, Russo N. P53, Cyclin D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2000; 16(4): 172–7.

12. Arora B, Jeevan D, Punia RS, Kumar S, Arora DR. AgNORs in squamous cell carcinoma of head and neck . JIMA issue 2002; 100(5): 315-16.

13. Ploton D, Menager M, Yeannesson P, Nimbor G. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem 1986; 40: 885–9.

14. Kobayashi I. The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyze proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region staining. Hum Pathol 1995; 26(8): 907-13.

۱۵. اسلامی ب. بررسی ارزش تشخیصی تعداد نقاط سازمان دهنده‌ی هسته‌ای با رنگ‌آمیزی نیترات نقره در اسکواموس سل کارسینومای مخاط دهان. مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۱۳۸۱؛ ۲۰ (۳):۸-۳۰۳.

16. Beer TW, Rowlands DC, Crocker J. AgNOR counts and determination of malignancy in stromal tumors of the stomach and small intestine. J Clin Pathol 1992; 4: 172–4.

17. Arora B. AgNOR in squamous cell carcinoma of head and neck. J Indian Med Assoc 2002; 100(5): 315-6.

18. Migaldi M, Pizo A. AgNOR nucleolar protein expression: a comparison with nuclear proliferating markers in oral pathology. Oral Surg Oral Med oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85(2): 189–96.

19. Sulkowska M. Proliferating activity in oral dysplastic leasions and squamous carcinomas. Folia Histochem Cytobiol 2001; 39: 193-9.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دندانپزشکی، تلفن: ۹-۲۲۹۱۴۰۸-۰۱۱۱.

ms_majidi79@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.7.4.9.2]