

## بررسی ارزش تشخیصی (AgNORs (Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions) در تومورهای غدد بزاقی

\*

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

**سابقه و هدف:** امروزه برای تشخیص نئوپلاسم ها علاوه بر رنگ آمیزی معمولی، از انواع مارکرهای سلولی و روشهای ایمونوهیستوشیمی استفاده میگردد که در شرایط کنونی بعلت پرهزینه بودن اکثر این روشها، باید بدنبال راههای تشخیصی ارزان تر و ساده تر مانند رنگ آمیزی نیترات نقره جهت بررسی نقاط سازمان دهنده هسته ای بود. این تحقیق با هدف بررسی ارزش تشخیصی رنگ آمیزی نیترات نقره در بین نئوپلاسمهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی انجام گرفت.

**مواد و روشها:** رنگ آمیزی نیترات نقره برای تعیین نقاط سازمان دهنده هسته ای بر روی ۲۲ مورد از شایعترین نئوپلاسم خوش خیم غدد بزاقی یعنی پلئومورفیک آدنوما، ۲۲ مورد نئوپلاسم بدخیم شایع غدد بزاقی شامل ۱۱ مورد آدنوئیدسیستیک کارسینوما و ۱۱ مورد موکوپای درموئید کارسینوما انجام گرفت. ۲۲ مورد از غدد بزاقی نرمال از نواحی اطراف همان نمونه ها نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته ها:** میانگین نقاط سازمان دهنده هسته ای در غدد بزاقی نرمال  $1/67 \pm 0/2$ ، در پلئومورفیک آدنوما  $2/32 \pm 0/39$ ، در آدنوئیدسیستیک کارسینوما  $3/92 \pm 1/11$ ، در موکوپای درموئید کارسینوما  $3/25 \pm 0/78$  و در کل بدخیمی ها  $3/58 \pm 1$  بوده میانگین این نقاط در بین گروههای خوش خیم و بدخیم، بدخیم و نرمال، خوش خیم و نرمال اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره جهت افتراق نئوپلاسم های خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی روش تشخیصی مناسبی می باشد.

**واژه های کلیدی:** پلئومورفیک آدنوما، آدنوئیدسیستیک کارسینوما، موکوپای درموئید کارسینوما، غدد بزاقی، نقاط سازمان دهنده هسته ای.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۲، فروردین - اردیبهشت ۱۳۸۵، صفحه ۲۳-۱۹

### مقدمه

که بعلت شباهت زیاد این تومورها از نظر الگوهای هیستولوژیک و به منظور به حداقل رساندن اشتباهات تشخیصی و بدست آوردن دقیق تر درجه بدخیمی، از انواع نشانگرهای سرطانی نظیر سایتوکراتین استفاده می شود (۳ و ۴) که به علت گرانی کیت ها و عدم دسترسی به آنها در آزمایشگاههای پاتولوژی، عملاً در همه جا مورد استفاده قرار نمی گیرد. در سالهای اخیر تعداد نقاط سازمان

تومورهای غدد بزاقی از ضایعات مهم ناحیه دهان و فک و صورت می باشند. گرچه این تومورها نادر هستند ولی بعلت اختصاصی بودن در این ناحیه حائز اهمیت می باشند (۱). این تومورها ۳٪ تومورهای سرو گردن و ۶٪ تومورهای بدن را تشکیل می دهند و تقریباً ۸۰٪ آنها خوش خیم هستند (۲). راه شناخت آنها برداشتن نمونه و آزمایشات هیستولوژیک با روش رنگ آمیزی H&E است

آمیزی با نیترات نقره، نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر شسته شده، سپس مجدداً تحت درجات صعودی الکل و بعد گزین قرار گرفته، مانت شدند. در مرحله آخر در هر اسلاید بطور تصادفی تعداد ۱۰۰ عدد هسته با درشت نمایی  $\times 100$  در تمامی گروهها مورد بررسی قرار گرفت. تعداد نقاط رنگ گرفته در هر هسته شمارش شد و نتایج بدست آمده بین گروههای خوش خیم، بدخیم و نرمال با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمونهای آماری one way Anova، Scheffe، t-test بر حسب مورد تجزیه و تحلیل شدند و  $p < 0.05$  معنی دار محسوب شد.

### یافته ها

میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده ی هسته ای در گروههای مختلف در جدول ۱ نشان داده شد (تصاویر ۴-۱). با استفاده از آزمون Scheffe مشخص گردید که بین شمارش NORs درموکوپای - درموئیدکارسینوما و آدنوئیدسیستیک کارسینوما اختلاف معنی داری وجود نداشته است، ولی در مقایسه بین سایر گروهها (گروه خوش خیم با بدخیم، گروه خوش خیم با غدد بزاقی نرمال و گروه بدخیم با غدد بزاقی نرمال) اختلاف معنی داری دیده شد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۱. وضعیت تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در سه گروه مورد مطالعه

| گروهها                               | تعداد | Mean±SD   |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| بافت نرمال غدد بزاقی                 | ۲۲    | ۱/۶۷±۵/۲  |
| نئوپلاسم خوش خیم (پلئومورفیک آدنوما) | ۲۲    | ۲/۳۲±۰/۳۹ |
| نئوپلاسم بدخیم:                      | ۲۲    | ۳/۵۸±۱    |
| موکوپای درموئید کارسینوما (n=۱۱)     |       |           |
| آدنوئیدسیستیک کارسینوما (n=۱۱)       |       |           |

p= /

همچنین با استفاده از آزمون Student's t-test اختلاف معنی داری بین تعداد NORs در الگوی هیستولوژیک میکسویید و توپر در پلئومورفیک آدنوما بدست نیامد. با استفاده از آزمون Schoffe نیز اختلاف آماری معنی داری بین گروههای غربالی، توپر و توبولی در آدنوئیدسیستیک کارسینوما وجود نداشت (جدول ۲).

دهنده هسته ای (Nucleolar Organizer Regions) که نشان دهنده فعالیت تکثیر سلولها می باشد نیز بعنوان شاخصی جهت تشخیص و تعیین پیش آگهی تومورهای غدد بزاقی مطرح شده است (۵-۱۰). نقاط سازمان دهنده هسته ای حلقه هایی از DNA هستند که بر روی کروموزوم های ۲۲، ۲۱، ۱۵، ۱۴، ۱۳ قرار دارند و RNA ریبوزومی را کد می کنند، لذا درستتر انواع پروتئینها نقش بسزایی دارند (۱۱). این نقاط با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره مشخص می شوند.

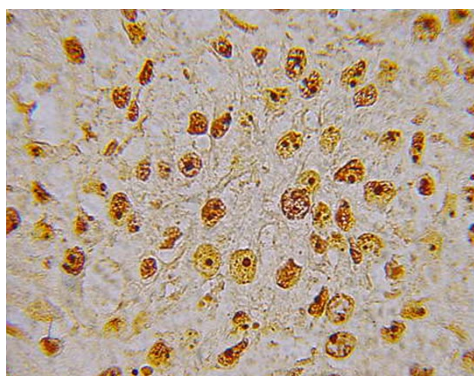
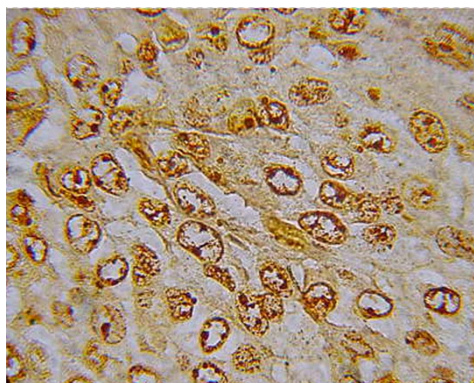
بنابراین این تحقیق با هدف بررسی ارزش تشخیصی رنگ آمیزی نیترات نقره در بین نئوپلاسمهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی انجام گرفت. نتایج این تحقیق صرف نظر از ارتقای دانش ما در زمینه بیولوژی سرطانها شاید بتواند در تشخیص تومورهای غدد بزاقی و درجه بندی آنها کمک کند و در درمان زودرس و افزایش طول عمر بیماران مؤثر باشد. همچنین از صرف هزینه های تشخیصی و درمانی سنگینتر و جراحیهای رادیکال جلوگیری نماید.

### مواد و روشها

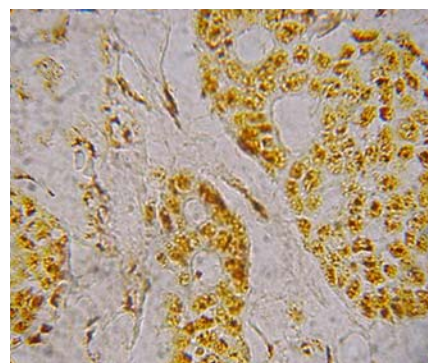
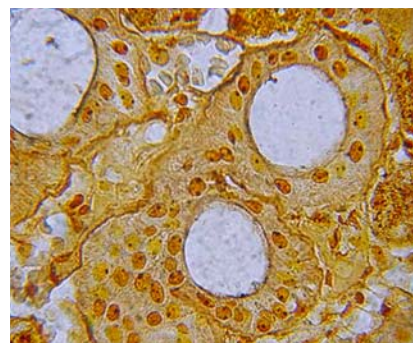
این تحقیق آزمایشگاهی بر روی ۲۲ نمونه ی پلئومورفیک آدنومای بزاقی از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی  $43/81 \pm 19/04$ ، ۱۱ نمونه موکوپایدرموئید کارسینوما از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی  $49/45 \pm 15/1$  و ۱۱ نمونه ی آدنوئیدسیستیک کارسینوما از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی  $52/18 \pm 15/3$  سال که بلوک های پارافینه مربوطه از انستیتوکانسر بیمارستان امام خمینی (ره) تهران در طی سالهای ۸۰-۱۳۷۵ جمع آوری شده بود، انجام شد. ۲۲ مورد از غدد بزاقی نرمال اطراف نمونه های فوق نیز انتخاب شد. بعد از تهیه برشهای ۵ میکرونی از بلوک های پارافینه، نمونه ها ابتدا در گزین موم گیری شده سپس بترتیب توسط الکلهای ۹۵٪، ۹۰٪ و ۷۰٪ آب داده شدند. بعد از شستشو با آب مقطر، اسلایدها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و محفظه کاملاً تاریک در محلول نیترات نقره قرار گرفتند و محلول نیترات نقره با مخلوط کردن یک قسمت از محلول شماره یک شامل ۲ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی لیتر اسید فرمیک ۱٪ با دو قسمت از محلول شماره ی دو نیترات نقره ۵۰٪ در آب مقطر بدست آمد. بعد از رنگ

جدول ۲. وضعیت NORs در الگوهای مختلف هیستولوژیک پلئومورفیک آدنوما و آدنوئیدسیستیک کارسینوما

| نام تومور                      | الگوی هیستولوژیک | تعداد | Mean±SD   | Pvalue |
|--------------------------------|------------------|-------|-----------|--------|
| پلئومورفیک آدنوما (n=۲۲)       | توپر             | ۱۱    | ۲/۴۶±۰/۳۴ | ۰/۲۳۸  |
|                                | میکسوئید         | ۱۰    | ۲/۱۶±۰/۴۲ |        |
|                                | استئوکندروئید    | ۱     | ۲/۳۶±۰    |        |
| آدنوئیدسیستیک کارسینوما (n=۱۱) | غریبالی          | ۵     | ۴/۶۵±۱/۱۵ | ۰/۱۱۵  |
|                                | توپر             | ۴     | ۳/۱۵±۰/۷۲ |        |
|                                | توبولی           | ۲     | ۳/۶۱±۰/۶۵ |        |



۱۱ مورد از نمونه های مورد بررسی مربوط به موکوپای- درموئید کارسینوما است که میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای برحسب درجه بدخیمی بترتیب (۱/۹۸)، (۳/۳۶) و (۳/۰۸) برای grade I، grade II، grade III می باشد. ارتباط معنی داری بین شمارش NORs در سه grade موکوپای درموئید کارسینوما با استفاده از آزمون آماری One way Anova دیده نشد.



## بحث و نتیجه گیری

اختلاف آماری معنی داری بین شمارش NORs در مقایسه بین بافت نرمال غدد بزاقی و نئوپلاسمهای خوش خیم و بدخیم دیده شد ( $p=۰/۰۰۰$ ). تعداد NORs از بافت نرمال تا نئوپلاسم خوش خیم و بتدریج تا نئوپلاسم بدخیم افزایش یافته بود که نشان دهنده فعالیت تکثیری بالاتر موارد بدخیم در مقایسه با خوش خیم و بافت نرمال و موارد خوش خیم در مقایسه با بافت نرمال می باشد. همچنین اندازه نقاط در نئوپلاسم های بدخیم نسبت به خوش خیم کاهش یافته و بصورت پراکنده در هسته دیده شدند، نتایج فوق در بررسی اسلیمی نیز مشاهده گردید (۱۲).

در این رابطه در تحقیقات Crocker بر روی ضایعات پوستی، اختلاف معنی داری بین ضایعات بدخیم با میانگین  $۷/۹ \pm ۱/۷$  و

ضایعات خوش خیم پوستی با میانگین  $1/21 \pm 0/23$ ، مشاهده شد که میزان آن در ملانوکارسینوما بیشتر از سایر ضایعات بوده است (۱۳). در سایر تومورهای پوستی، Egan نتایج مشابهی را بدست آورد (۱۴). در مورد تومورهای غده بزاقی نیز در تحقیق Van Heedren اختلاف معنی داری بین شمارش NORs در پلئومورفیک آدنوما با میانگین  $2/83 \pm 0/89$  و آدنوئیدسیستیک کارسینوما با میانگین  $1/52 \pm 0/32$  مشاهده شد (۱۵) که نتایج آن با یافته های تحقیق حاضر مطابقت دارد چرا که اختلاف آدنوئیدسیستیک کارسینوما با میانگین  $3/92 \pm 1/11$  و پلئومورفیک آدنوما با میانگین  $2/32 \pm 0/39$  از نظر آماری معنی دار می باشد.

در تحقیقی که توسط Comette و همکاران انجام شد نتیجه گرفتند که بین AgNORs و درجه بندی میکروسکوپی (grading) موکوبی درموئید کارسینوما و همچنین پیش آگهی تومور ارتباط وجود دارد (۱۶ و ۱۷). در مطالعه اخیر ارتباط معنی داری بین شمارش NORs در سه grade موکوبی درموئید کارسینوما با استفاده از آزمون آماری One - way Anova دیده نشد که شاید علت کم بودن تعداد نمونه ها و عدم تناسب تعداد آنها در سه grade موکوبی - درموئید کارسینوما باشد.

در تحقیقی که توسط Yamamoto بر روی آدنوئیدسیستیک کارسینوما انجام شد تفاوت آماری معنی داری بین سه الگوی هیستولوژیک تومور وجود داشت که میانگین نقاط در الگوی غربالی حداقل و در الگوی توپر، حداکثر بود (۱۷)، اسلامی نیز به نتیجه

مشابهی دست یافت (۱۲). ولی در تحقیق حاضر اختلاف آماری معنی داری بین گروهها وجود نداشت بطوریکه بین گروه توبولی و غربالی  $p=0/46$ ، بین توپر و غربالی  $p=0/12$  و بین توپر و توبولی  $p=0/81$  بوده است. همچنین در بررسی کلی مابین سه الگوی هیستوپاتولوژیک رایج در آدنوئید سیستیک کارسینوما در شمارش NORs رابطه معنی داری یافت نشد.

در بررسی حاضر بین الگوهای هیستولوژیک مختلف در پلئومورفیک آدنوما یعنی نواحی میکسوئید، استئوکندروئید و توپر نیز ارتباط آماری معنی داری بدست نیامد. اما در مطالعه اسلامی میان شمارش NORs در نواحی توپر با میکسوئید و استئوکندروئید اختلاف معنی داری حاصل شد (۱۲). این اختلاف ممکن است دلیل یکسان نبودن تعداد نمونه ها در الگوهای هیستولوژیک متفاوت در مطالعات ذکر شده باشد که نیاز به بررسی است. به طور خلاصه می توان گفت که تعداد NORs در بدخیمهای بزاقی بیشتر از تومورهای خوشخیم بزاقی بوده و می توان از این روش رنگ آمیزی برای افتراق نئوپلاسمهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی سود جست.

### تقدیر و تشکر

از کارکنان محترم بخش پاتولوژی انستیتو کانسر امام خمینی (ره) تهران که در کلیه مراحل این تحقیق ما را یاری نموده اند، سپاسگزاریم.

\*\*\*\*\*

### References

1. Neville BN, Douglas D. Oral & maxillofacial pathology, 2<sup>nd</sup> ed, W.B. Saunders Co 2002; pp: 408-30.
2. Midion M, Chidzonga VM, Lopezperez A, et al. A Clinicopathologic study of parotid gland tumors. J Oral Maxillofac Surg 1994; 52: 1253-6.
3. Yukio I, Toshiharu I. Adenoid cystic carcinoma from anterior lingual minor salivary gland: Immunohistochemistry and ultrastructural studies and review of Literature. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55: 1460-69.
4. Regezi JA, Zarbo RJ. Polymorphous low grade adenocarcinoma of salivary glands: A comparative histologic and immunohistochemical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1991; 71: 469-75.

5. Xin X , Nordgard S, Tore B. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinoma of head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997; 123: 615–20.
6. Edda AM, Hiroshima N. Correlation between argyrophilic nucleolar organizer regions counts and histologic grades with respect to biologic behavior of salivary adenoid cystic carcinoma. J Oral Pathol Med 1995; 24: 437–42.
7. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. Annals of Oncology 2004; 15(9): 1319-29.
8. Rivero E, Caliri M, Tarquinio S, Loyola A, Aguiar M. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. J Oral Science 2004; 46(2): 87-92.
9. Yamamura Y, Onodera K, Ichinohasama R, Ooya K. A histopathological study of lymphoepithelial island formation in labial salivary glands in patients with primary sjogren's syndrome. J Oral Pathol Med 2000; 29(3): 110-17.
10. Severgnini M, Ferraris ME, Carranza M. Nucleolar organizer regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. J Oral Pathol Med 2002; 31(10): 585-9.
11. Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. Nucleolar organizer regions in odontogenic cysts and ameloblastomas. J Oral Pathol Med 1996; 25: 436-40.
12. اسلامی ب، الکسانیان ا، مراد زاده م، شاهرخی م. بررسی ارزش تشخیصی تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در تومورهای غدد بزاقی. مجله دانشکده ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۱۳۸۲؛ ۲۱ (۱): ۷-۱.
13. Crocker J, Skibeck N. Nucleolar organizer regions associated proteins in cutaneous melanotic lesion: a quantitative Study. J Clin Pathol 1987; 40: 885-9.
14. Egan MJ, Crocker J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. J Pathol 1988; 145: 247-53.
15. Willie FP, Van Heerden EJ. Evaluation of the nucleolar organizer regions associated proteins in minor salivary gland tumors. J Oral Pathol Med 1991; 20: 291-5.
16. Comette G, Auriol M. Mucoepidermoid tumors of salivary glands: Histoprognotic value of NORs stained with AgNOR technique. J Oral Pathol Med 1991; 20: 130-32.
17. Yamamoto Y, Iton T. Nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. Arch Otorhinolaryngol 1995; 252: 176-80.