● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شمارهٔ ۲، فروردین – اردیبهشت ۱۳۸۵، صفحه ۲۳-۱۹
دریافت: ۸۳/۹/۷، پذیرش: ۸٤/٦/١٦

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

مریم سیدمجیدي [1*]، معصومه علیزاده [2]

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 ازشایعترین نئوپلاسم خوش خیم غدد بزاقی یعنی پلئومورفیک آدنوما، ۲۲ مورد نئوپلاسم بدخیم شایع غدد بزاقی شامل ۱۱ مورد آدنوئیدسیستیک کارسینوما و ۱۱ مورد موکواپی 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 ۰/۲ ± ۱/٦۷، درپلئومورفیک آدنوما ۰/۳۹±۲/۳۲، در آدنوئید سیستیک کارسینوما ۱/۱۱±۳/۹۲، در موکواپی درموئید کارسینوما ۰/۷۸±۳/۲۵ و در کل بدخیمی ها ۱±۳/۵۸ 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، آدنوئید سیستیک کارسینوما، موکواپی درموئید کارسینوما، غدد بزاقی، نقاط سازمان دهنده هسته ای.*

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شمارهٔ ۲، فروردین - اردیبهشت ۱۳۸۵، صفحه۲۳-۱۹

مقدمه

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 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(۳و۴) 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.2.3.9]

دهنده هسته ای (Nucleolar Organizer Regions) که نشان دهنده فعالیت تکثیری سلولها می باشد نیز بعنوان شاخصی جهت تشخیص و تعیین پیش آگهی تومورهای غدد بزاقی مطرح شده است(۱۰-۵). نقاط سازمان دهنده هسته ای حلقه هایی از DNA هستند که برروی کروموزوم های ۲۲، ۲۱، ۱۵، ۱۴، ۱۳ قرار دارند و RNA ریبوزومی را کد می کنند، لذا درسنتز 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 تومورهـای 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 ۱۹/۰۴±۴۳/۸۱، ۱۱ نمونه موکواپیدرموئید کارسینوما از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی ۱۵/۱±۴۹/۴۵ و ۱۱ نمونه ی آدنوئیدسیستیک کارسینوما از بیماران مبتلا به آن با میانگین سنی ۱۵/۳±۵۲/۱۸ 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 گزیلن 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 آمیزی با نیترات نقره، نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر شسته شده، سپس مجدداً تحت درجات صعودی الکل و بعد گزیلن قرار گرفته، مانت شدند. در مرحله آخر در هر اسلاید بطور تصادفی تعداد ۱۰۰ عدد هسته با درشت نمایی ۱۰۰× درتمامی 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 افزارSPSS و آزمونهای آماری one way Anova، Scheffe، t-test بر حسب مورد تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار محسوب شد.

یافته ها

میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده ی هسته ای در گروههای مختلف در جدول ۱ نشان داده شد(تصاویر۴-۱). با استفاده از آزمون Scheffe مشخص گردید که بین شمارش NORs درموکواپی - 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($p<۰/۰۵$).

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
موکواپی درموئید کارسینوما(n=۱۱)		
آدنوئیدسیستیک کارسینوما(n=۱۱)		

$p=۰/۰۰۰$

همچنین با استفاده از آزمون Student's t-test اختلاف معنی داری بین تعداد NORs در الگوی هیستولوژیک میکسوئید 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).

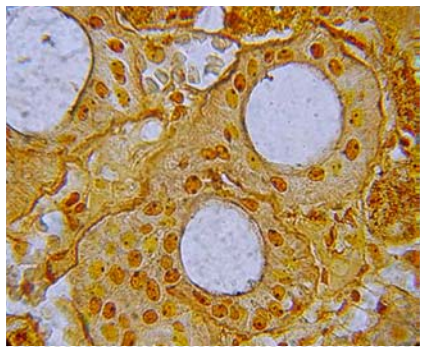
[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.2.3.9]

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

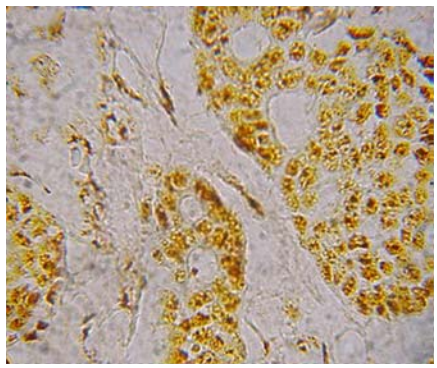
نام تومور	الگوی هیستولوژیک	تعداد	Mean±SD	Pvalue
پلئومورفیک	توپر	۱۱	۲/٤٦±۰/۳٤	۰/۲۳۸
آدنوما	میکسوئید	۱۰	۲/۱٦±۰/٤۲	
(n=۲۲)	استئوکندروئید	۱	۲/۳٦±۰	
آدنوئیدسیستیک	غربالی	۵	٤/٦۵±۱/۱۵	۰/۱۱۵
کارسینوما	توپر	٤	۳/۱۵±۰/۷۲	
(n=۱۱)	توبولی	۲	۳/٦۱±۰/٦۵	

۱۱مورد از نمونه های مورد بررسی مربوط به موکواپی-درموئید کارسینوما است که میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای برحسب درجه بدخیمی بترتیب (۱/۹۸)، (۳/۳۶) و (۳/۰۸) برای gradeI، grade II، gradeIII می باشد.

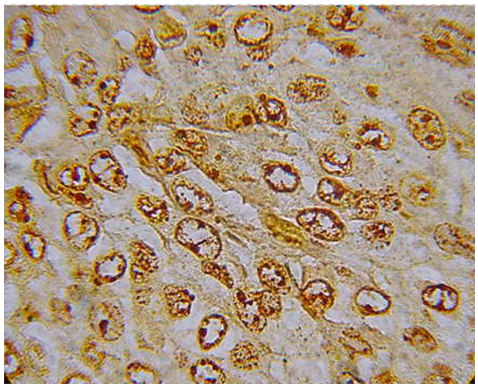
ارتباط معنی داری بین شمارش NORs در سه grade موکواپی درموئیدکارسینوما با استفاده از آزمون آماری One way Anova دیده نشد.



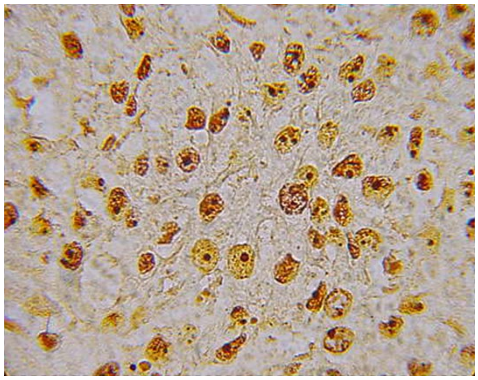
تصویر ۱. رنگ آمیزي نیترات نقره در بافت غده بزاقي نرمال



تصویر۲. رنگ آمیزي نیترات نقره در پلئومرفیك آدنوما



تصویر۳. رنگ آمیزي نیترات نقره در آدنوئید سیستیك کارسینوما



تصویر ۴. رنگ آمیزي نیترات نقره در موکواپي درموئید کارسینوما

بحث و نتیجه گیری

اختلاف آماری معنی داری بین شمارش NORs درمقایسه بین بافت نرمال غدد بزاقی و نئوپلاسمهـای خوش خیم و بدخیم دیده شد(p=۰/۰۰۰). تعداد NORs از بافت نرمال تا نئوپلاسـم 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 دیـده شدند، نتایج فوق در بررسی اسلامی نیز مشاهده گردید(۱۲).

در این رابطه در تحقیقات Crocker بر روی ضایعات پوستی، اختلاف معنی داری بین ضایعات بدخیم با میانگین۱/۷±۷/۹و

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.2.3.9]

ضایعات خوش خیم پوستی با میانگین۰/۲۳±۱/۲۱، 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). درمورد تومورهای غده بزاقی نیز در تحقیق Van Heedren اختلاف معنی داری بین شمارش NORs در پلئومورفیک آدنوما با میانگین ۰/۳۲±۱/۵۲ و آدنوئیدسیستیک کارسینوما با میانگین ۰/۸۹±۲/۸۳ مشاهده شد(۱۵) که نتایج آن با یافته های تحقیق حاضر مطابقت دارد چرا که اختلاف آدنوئیدسیستیک کارسینوما با میانگین ۱/۱۱±۳/۹۲ و پلئومورفیک آدنوما با میانگین ۰/۳۹±۲/۳۲ 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) موکواپی درموئید کارسینوما و همچنین پیش آگهی تومور ارتباط وجود دارد(۱۶و۱۲). در مطالعه اخیر ارتباط معنی داری بین شمارش NORs در سه grade موکواپی درموئید کارسینوما با استفاده از آزمون آماری One – way Anova دیده نشد که شاید بعلت کم بودن تعداد نمونه ها و عدم تناسب تعداد آنها در سه grade موکواپی– 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=۰/۴۶، بین توپر و غربالی p=۰/۱۲ و بین توپرو توبولی p=۰/۸۱ 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 بدلیل 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 بدخیمیهای بزاقی بیشتر ازتومورهای 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, 2nd 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 immunohischemical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1991; 71: 469–75.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.2.3.9]

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, Hirosoma 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, Caliari 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.

۱۲. 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): ۱–۷.

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: Histoprognostic 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.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشکده دندانپزشکی، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۹۱۴۰۸-۹.
ms_majidi79@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1385.8.2.3.9]