Archive of SID

مقایسه اندکس حاصل از رنگ‌آمیزی AgNOR در توده‌های بدخیم و خوش‌خیم پستانی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص)

*دکتر مریم کدیور I
دکتر علی‌محمد شفیعی II

چکیده

نواحی سامانگر هستک (NOR=nucleolar organizer regions) حلقه‌هایی از DNA حاوی ژنهای ریبوزومی هستند که RNA ریبوزومی، جهت پروتئین‌سازی، از روی آن ترجمه می‌شود. نواحی سامانگر هستک(NOR) در بازوی کوتاه کروموزومهای آکروسانتریک قرار دارند و حاوی پروتئینهای نقره‌دوست می‌باشند که در رنگ‌آمیزی کلوئید نقره به صورت نقاط سیاه‌رنگی به نام AgNOR مشاهده می‌شوند. تعداد AgNORها در هسته با میزان فعالیت تکثیری سلولی ارتباط مستقیم دارد. هر چه تعداد AgNOR بیشتر باشد، میزان فعالیت تکثیری آن بافت بیشتر است و احتمال بدخیم بودن آن نیز بیشتر می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارزشمند بودن AgNOR در افتراق توده‌های خوش‌خیم از توده‌های بدخیم پستانی است تا با استفاده از این رنگ‌آمیزی، از روی نمونه‌های کوچک بیوپسی، FNA، Touch imprint، Frozen section براحتی بتوانیم توده‌های خوش‌خیم را از بدخیم افتراق دهیم. در این مطالعه رنگ‌آمیزی AgNOR روی ۹۰ مقطع حاصل از برش بلوکهای پارافینی شامل ٤٥ مورد توده خوش‌خیم و ٤٥ مورد توده بدخیم انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد متوسط NOR رنگ شده توسط نقره (AgNOR)، در هر سلول از تومورهای خوش‌خیم پستان ٤/١٣ و در تومورهای بدخیم ۹/۸۲ است. با استفاده از t-test و oneway ANOVA test تفاوت آماری معنی‌داری بین متوسط AgNOR(Mean) توده‌های بدخیم و توده‌های خوش‌خیم پستانی وجود داشت بنابراین رنگ‌آمیزی AgNOR می‌تواند روشی ساده، مطمئن و کم هزینه جهت افتراق توده‌های خوش‌خیم از توده‌های بدخیم پستانی باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – نواحی سامانگر هستک(NOR) ۲ – روش رنگ‌آمیزی کلوئید نقره
۳ – ضایعات خوش‌خیم پستان ۴ – ضایعات بدخیم پستان

مقدمه

AgNOR از ۲ بخش Ag که علامت اختصاری نقره (Silver) است و NOR که مخفف Nucleolar Organizer Regions می‌باشد، تشکیل شده است. NOR مناطقی از مارپیچهای DNA و حاوی ژنهای ریبوزومی است که از روی آنها rRNA ترجمه شده و سبب پروتئین‌سازی می‌شود. NOR در بازوی کوتاه کروموزومهای آکروسانتریک ۱۳-۱٤-۱۵-۲۱-۲۲ وجود دارد که حاوی پروتئینهای نقره‌دوست مثل نوکلئولین، RNA پلی‌مراز I، پروتئین B23 و دیگر پروتئینهای غیرهیستونی اسیدی می‌باشند. با رنگ‌آمیزی نقره این پروتئینها رنگ سیاه به خود می‌گیرند(black dot).

اهمیت پژوهش: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و امروزه بعد از سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ در اثر سرطان در زنان می‌باشد(۱، ۲و ۳).

این مقاله خلاصه‌ایست از پایان نامه دکتر علی‌محمد شفیعی جهت اخذ مدرک دکترای تخصصی پاتولوژی به راهنمایی خانم دکتر مریم کدیور، سال ۱۳۸۰.

I) استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران(*مولف مسؤول)
II) دستیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران.

www.SID.ir

Archive of SID

در ایالات متحده ازهر ۹ زن ۱ نفر در طول مدت عمر خود دچار سرطان می‌شود که ۱/۳ آنها می‌میرند و بطور کلی سالانه سبب بیش از ٤٤۰۰۰ مورد مرگ می‌گردد(۲، ۳و ٤).

اغلب بیماریهای پستانی به صورت توده (Mass) بروز می‌کنند که در کلینیک، افتراق خوش‌خیم بودن از بدخیم بودن توده مشکل می‌باشد.

امروزه نمونه‌های ارسالی برای آسیب‌شناس هر روز کوچکتر و کمتر می‌شود. گذاشتن تشخیص روی نمونه‌های FNA، Touch imprint، Frozen section و بیوپسی‌های کوچک بسیار مشکل می‌باشد.

افتراق ضایعاتی مثل میکروگلاندولار آدنوزیس (MicroGlandular Adenosis) از توبولار کارسینوما (tubular CA) یا آدنوزیس اسکلروزان (Sclerosing Adenosis) از کارسینوم مجرایی مهاجم (Invasive ductal carcinoma) حتی در نمونه‌های بزرگ حاصل از لامپکتومی (Lampectomy) یا جراحی رادیکال بسیار مشکل است(۲و ۳).

بنابراین در نمونه‌های کوچک ذکر شده احتمال خطا بسیار بالا می‌رود. تستهای متعدد و پیچیده‌ای برای حل این مشکل ابداع شده است.

تستهایی مثل فراکسیون S سیکل سلولی با تیمیدین نشاندار، فلوسیتومتری، اندکس میتوز و سیتومتری با تصویربرداری کامپیوتری، برای ارزیابی میزان فعالیت تکثیر سلولی، میزان تمایز سلولی قدرت تهاجم و در نهایت کمک به تعیین پیش‌آگهی بیمار، به وجود آمدند.

تمام این روشها نیاز به صرف وقت، هزینه زیاد و نیز تربیت نیروی متخصص دارد، اما رنگ‌آمیزی AgNOR یک روش کمکی ارزان، سریع و در دسترس است که نیاز به تربیت نیروی متخصص ندارد و آسیب‌شناس با تکیه بر نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی با اطمینان خاطر بیشتری می‌تواند تشخیص را مطرح نماید.

در این تحقیق سعی شد تا بر اساس رنگ‌آمیزی NOR و شمارش آن در هسته تومورهای خوش‌خیم و بدخیم، معیاری جهت تفکیک ظاهری این ضایعات تعیین گردد تا از بروز اختلاف نظر پیرامون تشخیص صحیح در ضایعات مزبور جلوگیری شود.

آیا رنگ‌آمیزی AgNOR توانایی افتراق توده‌های بدخیم از توده‌های خوش‌خیم پستانی را دارد؟

بررسی پیشینه پژوهش: اولین بار در سال ۱۹۸۸ آقایان Crocker و Smith، رنگ‌آمیزی AgNOR را در ۲۰۰ مورد کارسینوم پستان مورد بحث قرار دادند و اندکس AgNOR را به عنوان یک متغیر، با متغیرهای دیگر مثل سایز سلولی، درجه (grade) هیستولوژیک، تعداد گره‌های لنفاوی درگیر و متاستاز مقایسه کردند.

آنها نتیجه گرفتند که هر چه اندکس AgNOR بیشتر باشد، سایز سلولی بزرگتر، درجه بافت‌شناسی بالاتر، تعداد گره‌های لنفاوی درگیر بیشتر و میزان متاستاز بیشتر می‌باشد(۵).

Lea-Rath در Acta cytologica رنگ‌آمیزی AgNOR روی FNA حاصل از ۵۲ مورد بیماری فیبروکیستیک و ۱۵ مورد فیبروآدنوما و ٤۵ مورد کارسینوم را گزارش کردند.

آنها از نظر آماری (Pvalue<۰/۰۰۱) تفاوت واضحی بین ضایعات بدخیم و خوش‌خیم پستانی یافتند اما بین فیبروآدنوما و بیماری فیبروکیستیک و نیز بین لوبولار کارسینومای مهاجم و کارسینوم مجرایی مهاجم تفاوتی پیدا نکردند(٦).

Subra manian در Journal of surgical oncology مطالعه خود را گزارش کرد که در این مطالعه اندکس AgNOR را در ۲۰۰ بیمار بررسی نمود و نتیجه گرفت که اندکس بالای AgNOR با سایز بزرگ سلول، درجه III تومور و متاستاز همراه می‌باشد و هر چه مقدار AgNOR در توموری بالاتر باشد میزان بقای بیمار کمتر است(۷).

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

در این طرح پژوهشی ۹۰ بیمار که با توده پستانی به بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص) مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

از ٤٥ مورد توده‌های خوش‌خیم، ۲ مورد داکت اکتازیا (Duct Ectasia)، ۳ مورد ژنیکوماستی، ۱۹ مورد فیبروآدنوما، ۲۱ مورد بیماری فیبروکیستیک بودند و ٤٥ مورد توده‌های بدخیم و همگی کارسینوم مجرایی مهاجم بودند.

در این روش مقاطعی از بلوکهای پارافینی که قبلاً تشخیص آسیب‌شناسی آنها تعیین و تایید شده بود، توسط میکروتوم با ضخامت ٥ میکرون تهیه شد. سپس این نمونه‌ها با استفاده از گزیلول، موم‌زدایی (dewax) شدند.

در مرحله بعد به واسطه بور، از ظرف حاوی الکل با درجه خلوص کاهش یابنده آبدهی شده، در ظرف حاوی آب قرار داده شدند و جهت رنگ‌آمیزی آنها از شیوه crocker و همکاران به این شکل استفاده شد:

محلول A: ٥٠ گرم نیترات نقره را در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده محلول ٥٠٪ نیترات نقره را ساختیم.

محلول B: ۲ گرم پودر ژلاتین را در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حاوی ۱ گرم اسیدفرمیک، در دمای ٦٠ تا ۷۰ درجه حل کردیم.

محلول کار: ۲ حجم محلول A را با یک حجم محلول B مخلوط کردیم (محلول کار بلافاصله بعد از تهیه باید مورد استفاده قرار گیرد).

لامها را به مدت ۳۰ تا ٤٠ دقیقه در محلول کار در محل بدون نور قرار دادیم سپس با آب دیونیزه شستشو دادیم، سپس در محلول غلیظ شونده الکل آب‌گیری کردیم (رنگ‌آمیزی مخالف لازم نیست).

اگر از بلوکهای پارافینی استفاده می‌شود باید مرحله پارافین‌گیری به وسیله گزیلول انجام شود و از حرارت استفاده نگردد. چگونگی شمارش AgNOR: ابتدا اسلایدها را با بزرگنمایی ٤٠ بررسی کردیم و مناطقی را که دارای کمترین overlap سلولی، رسوب و Airdry بودند، انتخاب کردیم.

لامهایی که ضعیف رنگ شده بودند از مطالعه خارج شدند. AgNOR به صورت نقاط سیاهرنگ داخل هسته دیده شد که به ۲ گروه تقسیم گردید.

Fine AgNOR که نقاط سیاه‌رنگ هموژن با لبه‌های ظریف مشخص به قطر ۱ تا ٥ میکرون و Coarse AgNOR که نقاط سیاه رنگ خشن درشت به قطر بزرگتر از ٥ میکرون بودند.

بعضی از محققین فقط Coarse AgNOR را شمارش می‌کنند اما بعضی دیگر هر دو را می‌شمارند. در این تحقیق Coarse AgNOR و Fine شمرده شدند.

سپس با بزرگنمایی ۱۰۰ و با روغن ایمرسیون AgNOR در تعداد ۱۰۰ سلول شمرده شد و از این ۱۰۰ عدد میانگین گرفته شد و به عنوان اندکسAgNOR در لام مربوطه ثبت گردید. در طی مطالعه، آسیب‌شناس تشخیص ضایعه را نمی‌دانست.

نتایج

نتایج بدست آمده براساس شمارش AgNOR عبارت بودند از: الف) ۲ مورد داکت اکتازیا: از ۳/۱۸ تا ٥/٢٤ (متوسط=٤/٢١)، ب) ۳ مورد ژنیکوماستی: از ۳/۲٦ تا ۳/۹۲(متوسط=۳/٥٦)، ج) ۱۹ مورد فیبروآدنوما: از ۳/۲۷ تا ٥/٤٦(متوسط=٤/٥١)، د) ۲۰ مورد بیماری فیبروکیستیک: از ۲/۸۷ تا ٤/۹٦(متوسط=۳/۸٦)، ه) ٤٥ مورد کارسینوم مجرایی مهاجم: از ۷/۹۲ تا ۱۱/۹۸(متوسط=۹/۸۲).

بحث

براساس onewayANOVA-test با (Pvalue<۰/۰۰۰)، اندکس AgNOR هر یک از ضایعات خوش‌خیم ذکر شده در بالا با کارسینوم مهاجم مجرایی تفاوت آماری واضح داشت(جدولهای شماره ۱و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- مقایسه موارد خوش‌خیم با کارسینوم مجرایی(بدخیم) از نظر آماری

	N	میانگین	انحراف معیار	اشتباهات	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین: حد مینیمم	حد ماکزیمم	حداقل	حداکثر
داکت‌اکتازیا	۲	٤/۲۱۰۰	۱/٤٥٦٦	۱/۰۳۰۰	-۸/۸۷۷٤	۱۷/۲۹۷٤	۳/۱۸	٥/۲٤
ژنیکوماستی	۳	۳/٥٦۰۰	۰/۳۳٤۱	۰/۱۹۲۹	۲/۷۳۰۱	٤/۳۸۹۹	۳/۲٦	۳/۹۲
فیبروآدنوما	۱۹	٤/٥۱۳۷	۰/٥۱۰۸	۰/۱۱۷۲	٤/۲٦۷٥	٤/۷٥۹۹	۳/۲۷	٥/٤٦
بیماری فیبروکیستیک	۲۱	۳/۸٦۱٤	۰/٦٦۷۲	۰/۱٤٥٦	۳/٥٥۷۷	٤/۱٦٥۲	۲/۸۷	٤/۹٦
بدخیم	٤٥	۹/۸۲٦۰	۰/۹۳۹٤	۰/۱٤۰۰	۹/٥٤۳۸	۱۰/۱۰۸۲	۷/۹۲	۱۱/۹۸
جمع کل	۹۰	٦/۹۷۹۱	۲/۹۷۸٤	۰/۳۱٤۰	٦/۳٥٥۳	۷/٦۰۲۹	۲/۸۷	۱۱/۹۸

جدول شماره ۲- استاندارد نتایج تحلیل واریانس یک طرفه(ANOVA)

	مجموع مجذورات	درجه آزادی (df)	میانگین مجذورات	آزمون(F)	معنی‌دار بودن(.Sig)
بین گروهها(Between Groups)	۷۳٤/۷۲۹	٤	۱۸۳/٦۸۲	۲۸٥/۰٤٥	۰/۰۰۰
بدون گروهها(Within Groups)	٥٤/۷۷٤	۸٥	۰/٦٤٤		
جمع کل	۷۸۹/٥۰۳	۸۹			

بر اساس t-test (جدولهای شماره۳، ٤و ٥) (با Pvalue<۰/۰۰۰) اختلاف آماری واضحی بین اندکس AgNOR گروه بدخیم و خوش‌خیم وجود داشت و نیز براساس Kruskal Wallis-test، Chi square با Pvalue<۰/۰۰٤ (جدولهای شماره٦و ۷) بین فیبروآدنوما و بیماری فیبروکیستیک اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت.

جدول شماره ۳- T-test برای تمایز بین ضایعات خوش‌خیم و بدخیم

	تشخیص	تعداد	میانگین	انحراف معیار	انحراف میانگین
AgNOR	بدخیم	٤٥	۹/۸۲٦۰	۹۳۹٤	۰/۱٤۰۰
	خوش‌خیم	٤٥	٤/۱۳۲۲	٦۹٤۹	۰/۱۰۳٦

جدول شماره ۴- نمونه‌های آزمون استقلال

		آزمون لون		آزمون T برای تساوی میانگین با					
		آزمون	معنی‌دار	آزمون	درجه آماری	اختلاف میانگین	Std.Error Difference	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین‌ها	
								Lower	Upper
AgNOR	فرض تساوی واریانسها	۳/٥٥۷	/۰٦۳	۳۲/٦۸۸	۸۸	٥/٦۹۳۸	۰/۱۷٤۲	٥/۳٤۷٦	٦/۰۳۹۹
	عدم فرض تساوی واریانسها			۳۲/٦۸۸	۸۱/۰٥٥	٥/٦۹۳۸	۰/۱۷٤۲	٥/۳٤۷۲	٦/۰٤۰۳

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۵- بررسی نمونه‌های خوش‌خیم و بدخیم از نظر میزان AgNOR

توده(Mass)	میانگین	انحراف معیار	میانه	٪۹۷ فاصله اطمینان	حداقل	حداکثر
خوش‌خیم	٤/١٣	+٠/٦٩	٤/٢٠	٢/٧٢-٥/٥٤	٢/٨٧	٥/٤٦
بدخیم	٩/٨٢	+٠/٩٣	٩/٧٨	٧/٩٦-١١/٧٠	٧/٩٢	١١/٩٨

جدولهای شماره ۶و۷- تست Kruskal-Wallis برای تمایز بین فیبروآدنوما و ضایعات فیبروکیستیک

	تشخیص	تعداد	ترتیب میانگین
AgNOR	٣	١٩	٢٦/٠٨
	٤	٢١	١٥/٤٥
	تعداد کل	٤٠	
آزمون آماری(Test Statisticsa)			
Chi-Square(توزیع کای)			٨/٢٤٨
Df(درجه آزادی)			١
Asymp.Sig.(مقدار P)			٠/٠٠٤
اختلاف معنی‌دار میانگین با a٠/٠٠٤			

در انتها اندکس AgNOR به دست آمده از این مطالعه با اندکس AgNOR مطالعات دیگر مقایسه شده است.

جدول شماره ۸- متوسط نقاط AgNOR در ضایعات مختلف پستان در مطالعات چاپ شده

Author	خوش‌خیم	بدخیم
Smith*	٥/٦+١/٥	١٣/٣+٣/٩
Giri*	٢/٨+٠/٤	٤/٤+١/٢
Dervan*	٤/٩+١/٣	١٣/٧+٥/٢
Raymond+	٢/١+٠/٦	٥/٥+٢/٣
Moural+	–	٣+٠/٦
Giri+	١/٩+٠/٣	٤/٢+١/٢
M.Meehan*	٤/٤٤+٢	٩/٥٢+٢/٢
My study*	٤/١٣+١/٣	٩/٨٢+٢/٩

+ اعداد کوچکتر زمانی که محقق فقط coarse AgNOR را می‌شمارد به دست می‌آیند.

*اعداد بزرگتر زمانی که محقق هم fine و هم AgNOR coarse را می‌شمارد به دست می‌آیند.

پیشنهادات

۱- با توجه به ساده و ارزان بودن رنگ‌آمیزی AgNOR، می‌توان یکی از لامهای تهیه شده از Frozen section، Touch imprint، FNA و یا بلوکهای پارافینی را با این روش رنگ‌آمیزی نمود تا براحتی ضایعات خوش‌خیمی مثل آدنوز اسکلروزان، میکروگلاندولار آدنوزیس و غیره را از بدخیمی افتراق داد. ۲- با توجه به مطالعات انجام شده با رنگ‌آمیزی AgNOR می‌توان مرحله(stage) بیماری را حدس زد. هر چه اندکس AgNOR بالاتر باشد، مرحله بیماری بالاتر است. ۳- با رنگ‌آمیزی AgNOR می‌توان پیش‌آگهی بیماری و نیز میزان بقای بیمار را پیش‌بینی کرد که اندکس AgNOR بالا با پیش‌آگهی بد و میزان بقای کم همراه است. ٤- جهت حذف خطای مشاهده‌گر بهتر است از Computerized Image Analysis استفاده شود.

منابع

1- Silverberg S., "Surgical Pathology and cytopathology", 3 rd ed, USA, churchill Livingstone, 1997, PP: 575- 674.

2- Sternberg S., "Dignostic surgical pathology", 3 rd ed., USA., lippincott Williams, 1999, PP: 319-387.

3- Rosai J., Ackerman's surgical pathology, 8 th ed., USA., Mosby 1995, PP: 1565- 1660.

4- Robbins S., "Pathologic Basis of Disease" 6 th ed., USA., Saunders., 1999.,PP: 1093-1119.

5- Mourad W., "The Argyrophilic Nucleolar organizer in Ductal carcinoma insitu of the Breast"., Cancer,1994, 74: 2320- 2327.

6- Rath L., Wolfson S., "Nucleolar organized Regions in Breast cytology"., Acta cytologic, 1995, Vol: 852-905.

7- Subramanian S., "AgNOR and their relationship of cell size, Histological Grade, lymph Node involvement, metastases and survival pattern in carcinoma of the Breast", Journal of surgical oncology, 1996, 62:139-143.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

THE COMPARISON EVALUATION OF AgNOR INDEX IN THE MALIGNANT AND BENIGN BREAST MASSES

*M. Kadivar, MD [I] A.M. Shafiee, MD [II]

ABSTRACT

Nucleolar organizer regions(NORs) are loops of DNA included ribosomal genes that ribosomal RNA translated of it, which synthesis proteins. NORs are in short arms of acrocentric chromosomes and associated with argyrophilic proteins, which are seen as black dots, termed "AgNOR", by using colloidal silver (Ag) staining method. AgNOR count in nucleous have direct relation with cellular proliferative activity. The significance of this study is to evaluate the potential value of AgNOR in differentiating benign from malignant lesions, particullary, on the slide prepared from small biopsy, Frozen section, FNA and touch imprint, that are difficult to definite diagnosis by routin H&E staining. In this study, AgNOR stained on 90 section of paraffin embeded blocks included, 45 benign lesions and 45 malignant lesions. The average number of NORs in benign lesion and malignant tumor were 4.13 and 9.82 respectively. By using t-test and one way ANOVA-test, significant statistical difference is between benign and malignant lesions, so AgNOR staining is a simple, rapid and cheap method in difinite diagnosis of benign from malignant breast lesions.

Key Words: 1) Nucleolar organizer regions(NOR) 2) AgNOR Staining Method

3) Benign lesion of breast 4) Malignant lesion of breast

Archive of SID

This article is the summary of the degree of spicialty in pathology of A.M.Shafiee,MD under supervision of M.Kadivar, MD, 2001.

I) *Assistant professor of pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.(*Corresponding author)*

II) *Resident of pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

www.SID.ir