

## بررسی ارزش تشخیصی تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در تومورهای غدد بزاقی

دکتر بهنام اسلامی\*، دکتر استپان الکسانیان\*\*، دکتر منیر مرادزاده خیابوی\*\*\*، دکتر محمود شاهرخی\*\*\*\*

### *Diagnostic value of Nucleolar Organizer Regions (NORs) in salivary gland tumors*

<sup>1</sup>Eslami B. DDS, MS; <sup>2</sup>Alexanian E DDS, MS; <sup>3</sup>Moradzadeh khiavi M. DDS, MS; <sup>4</sup>Shahrokhi M. DDS

<sup>1</sup> Assistant Prof., <sup>2</sup> Assoc. Prof. Dept. of Oral and Maxillofacial Pathology, Dental school, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran - IRAN.

<sup>3</sup> Assistant Prof. Dept. of Oral and Maxillofacial Pathology, Dental school., Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz - IRAN.

<sup>4</sup> Dentist.

**Keywords:** Malignant, Benign, Salivary gland, AgNORs

**Background:** Several diagnostic methods are being employed to detect benign and malignant lesions. One of which is silver nitrate staining for nucleolar organizer regions (NORs). Researches have shown such regions as being useful in comparison of the tumors for determination of changes.

**Aim:** This study was designed to evaluate NORs as determinant for malignancy in salivary gland tumors.

**Material and Methods:** A silver colloid technique was applied on paraffin sections of 12 cases of pleomorphic adenoma, 12 cases of Mucoepidermoid carcinoma and 12 Adenoid cystic carcinoma. A group of 12 specimens were selected with normal salivary gland tissue.

**Results:** AgNORs were seen in  $1.69 \pm 0.19$  percent of the cases in normal tissue,  $1.71 \pm 0.15$  in pleomorphic adenoma,  $2.18 \pm 0.94$  in mucoepidermoid carcinoma and  $2.61 \pm 0.45$  in adenoid cystic carcinoma. Statistically significant differences were seen in AgNORs numbers between mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma with pleomorphic adenoma and normal tissue ( $P < 1/0001$ ) similar results were seen between the different histologic pattern in adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma ( $P < 0/05$ ).

**Conclusion:** The silver nitrate staining for nucleolar organizer (NORs) is a useful method for detection of malignant salivary gland tumors.

*Beheshti Univ. Dent. J.* 2003; **21(1)**: 1-7.

### خلاصه

در سالهای اخیر مطالعه بر روی نواحی سازمان دهنده هسته ای مورد استقبال بسیاری از پاتولوژیستها قرار گرفته است و بیشتر آنها شمارش نقاط سازمان دهنده هسته ای را برای تشخیص افتراقی هیستولوژیک میان تومورهای خوش خیم و بدخیم و درجه بندی تومورها مفید می دانند. در این تحقیق، تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در شایع ترین تومورهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی در نمونه های

\* استادیار گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\* دانشیار گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\* استادیار گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

فایل شده در انستیتو کانسر ایران در طی سالهای ۷۶-۱۳۷۲ مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف آماری معنی داری میان تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در تومورهای خوش خیم و بدخیم بزاقی، میان موکو اپیدرموئید کارسینوما با پلئومورفیک آدنوما و بافت نرمال و آدنوئید سیستیک کارسینوما با پلئومورفیک آدنوما و بافت نرمال دیده شد ( $p < 0/0001$ )

واژه های کلیدی: نقاط سازمان دهنده هسته ای، غدد بزاقی، تومورخوش خیم غدد بزاقی، تومور بدخیم غدد بزاقی .  
مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال ۱۳۸۲: جلد ۲۱(۱): صفحه ۱ الی ۷

### مقدمه

پروتئینها نقش بسزایی دارند<sup>(۱)</sup>. در این تحقیق تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در شایعترین تومورهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی در نمونه های فایل شده در انستیتو کانسر ایران در طی سالهای ۷۶-۱۳۷۲ مورد بررسی قرار گرفته، ارزش تشخیصی (NORS) مشخص شد. نتایج این تحقیق صرف نظر از ارتقاء دانش ما در زمینه بیولوژی سرطانها شاید بتواند در تشخیص قطعی و به موقع تومورهای غدد بزاقی و درجه بندی آنها به ما کمک کند و در درمان زودرس و افزایش طول عمر بیماران مؤثر باشد و از صرف هزینه های تشخیصی و درمانی سنگین تر و جراحیهای رادیکال جلوگیری نماید.

### مواد و روشها

این تحقیق از نوع توصیفی مقطعی بوده، روش آن مشاهده و استفاده از فرم اطلاعاتی می باشد. در این تحقیق، بلوکهای پارافینی مربوط به بیماران دارای پلئومورفیک آدنوما، آدنوئید سیستیک کارسینوما و موکو اپیدرموئید کارسینوما موجود در آرشیو بخش پاتولوژی انستیتو کانسر ایران در طی سالهای ۷۶-۱۳۷۲ انتخاب شدند. بعد از تهیه

تومورهای غدد بزاقی از ضایعات مهم ناحیه دهان و فک و صورت می باشند. گرچه این تومورها نادر هستند ولی بعلا اختصاصی بودن در این ناحیه حائز اهمیت می باشند<sup>(۱)</sup>. این تومورها ۳٪ تومورهای سرو گردن و ۶٪ تومورهای بدن را تشکیل می دهند و تقریباً ۸۰٪ آنها خوش خیم هستند<sup>(۲)</sup>. راه شناخت آنها برداشتن نمونه و آزمایشات هیستولوژیک با روش رنگ آمیزی H & E می باشد که بعلا 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 سایتو کراتین در تشخیص استفاده می شود<sup>(۳-۵)</sup>. که بعلا گرانی کیتها و عدم دسترسی به آنها در آزمایشگاههای پاتولوژی، عملاً در ایران مورد استفاده قرار گیرند. در سالهای اخیر تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای (Nucleolar Organizer Regions) نیز بعنوان شاخص جهت تشخیص و تعیین پیش آگهی تومورهای غدد بزاقی مطرح شده است<sup>(۶-۸)</sup> که برخی از تحقیقات ارزش مشابهی را تایید نمی کنند<sup>(۹)</sup>. نقاط سازمان دهنده هسته ای حلقه هایی از DNA هستند که بر روی کروموزومهای ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ قرار دارند و RNA ریوزومی را کد می کنند، لذا در سنتز انواع

شایعترین محل نمونه های پلئومورفیک آدنوما (۴۱٪ موارد) و موکوپیدرموئید کارسینوما (۵۸٪ موارد) ناحیه پاروتید و آدنوئید سیستیک کارلینوما (۳۸٪ موارد) در غدد بزاقی فرعی بود. نسبت مرد به زن در پلئومورفیک آدنوما مساوی بود. ۷۵٪ موکوپیدرموئید کارسینوما در مردان و ۵۴٪ آدنوئید سیستیک کارسینوما در زنان دیده شد. همچنین ۱۲ بلوک پارافینی مربوط به بافت نرمال حاشیه تومورها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

میانگین تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در چهار گروه مورد بررسی در جدول شماره یک آمده است.

جدول ۱- تعداد، میانگین و انحراف معیار نقاط سازمان دهنده هسته ای در ۴ گروه

گروه	شاخص	N	$\bar{X}$	SD
بافت نرمال		۱۲	۱/۶۹	۰/۱۹
پلئومورفیک آدنوما		۱۲	۱/۷۱	۰/۱۵
موکوپیدرموئید کارسینوما		۱۲	۲/۶۱	۰/۴۵
آدنوئید سیستیک کارسینوما		۱۲	۲/۷۸	۰/۹۴

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می گردد که تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در آدنوئید سیستیک کارسینوما و موکوپیدرموئید کارسینوما بیشتر از بافت نرمال و پلئومورفیک آدنوما می باشد و آزمون آماری One-Way Anova اختلاف معنی دار میان ۴ گروه فوق را نشان داد ( $P < 0/0001$ ). بدلیل حجم نمونه برابر در ۴ گروه، از پیش فرض خاصی استفاده نشد.

برشهای ۵ میکرونی از بلوکهای پارافینه، نمونه ها ابتدا در گزین موم گیری شده سپس بترتیب توسط الکل های 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. 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 دو نیترات نقره ۵۰٪ در آب مقطر بدست می 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 گزین قرار گرفته، مانت شدند. در مرحله آخر در هر اسلاید بطور تصادفی تعداد ۱۰۰ عدد سلول با درشت نمائی  $\times 100$  در هر ۴ گروه مورد بررسی قرار گرفتند. متغیرهای مورد بررسی شامل تعداد نقاط رنگ گرفته در هر هسته بودند. در انتها، میانگین نتایج در هر نمونه بدست آمد.

#### یافته ها

- این تحقیق بر روی نمونه های پارافینه بیماران زیر انجام شد.
- ۱۲ بیمار مبتلا به پلئومورفیک آدنوما با میانگین سنی ۴۰ سال
  - ۱۲ بیمار مبتلا به موکوپیدرموئید کارسینوما با میانگین سنی ۳۶ سال
  - ۱۲ بیمار مبتلا به آدنوئید سیستیک کارسینوما با میانگین سنی ۳۳ سال

آزمون واریانس گروهها با هم برابر بودند . با استفاده از آزمون Scheffe مشاهده شد که میان نواحی Solid با میکسوئید و استنوکندرئید اختلاف معنی داری وجود دارد.

جدول ۴- میانگین و انحراف معیار تعداد نقاط سازمان دهنده

هسته ای در سه الگوی هیستولوژیک آدنئید سیستمیک

کارسینوما

SD	$\bar{X}$	N	شاخص / گروه
۰/۴۱	۲/۳۸	۱۰	غربالی
۰/۴۶	۲/۶۴	۱۱	لوله ای
۰/۵۲	۳/۰۷	۷	توپر

در مورد الگوهای هیستولوژیک آدنئید سیستمیک کارسینوما و با استفاده از آنالیز آماری One-Way-Anova مشاهده د که اختلاف معنی داری میان ۳ گروه بدست آمد ( $P < 0/05$ ). در این آزمون نیز واریانس گروهها برابر بود . با استفاده از آزمون scheffe مشاهده شد که میان الگوهای solid با Cribriform و Tubular اختلاف معنی داری وجود دارد ولی اختلاف میان Cribriform و Tubular معنی دار نیست .

جدول ۵- میانگین و انحراف معیار تعداد نقاط سازمان دهنده

هسته ای در سه grade مختلف موکو اپیدرمئید کارسینوما

SD	$\bar{X}$	N	شاخص / گروه
۰/۵۱	۲/۱۹	۴	Grade I
۰/۰۱	۲/۳۵	۲	Grade II
۰/۸۸	۳/۳۳	۶	Grade III

با استفاده از آزمون آماری Post Hoc test:Scheffe مشاهده شد که اختلاف میان آدنئید سیستمیک کارسینوما و موکو اپیدرمئید کارسینوما با گروه نرمال و پلئومورفیک آدنوما با بافت نرمال معنی دار نبود .

در مورد تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای در آسینی ها و مجاری بافت نرمال نتایج زیر بدست آمد.

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار تعداد نقاط سازمان دهنده

هسته ای در آسینی ها و مجاری بافت نرمال

SD	$\bar{X}$	N	شاخص / گروه
۰/۱۸	۱/۶۵	۱۲	آسینی
۰/۲	۱/۶۷	۱۲	مجرا

در میان دو گروه فوق اختلاف آماری، معنی داری نبود و آزمون  $t$  - Student test اختلاف را نشان نداد. در مورد پلئومورفیک آدنوما سه نمای هیستولوژیک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار تعداد نقاط سازمان دهنده

هسته ای در سه نمای هیستولوژیک پلئومورفیک آدنوما

SD	$\bar{N}$	N	شاخص / گروه
۰/۱۳	۱/۶۸	۸	میکسوئید
۰/۲۲	۱/۶۳	۹	استنوکندرئید
۰/۲	۱/۸۷	۹	توپر

با توجه به نتایج حاصل و با استفاده از آزمون آمار One-Way Anova مشاهده شد که اختلاف معنی داری میان ۳ گروه وجود دارد ( $p < 0/05$ ). در این

در مورد موکوپیدرومئید کارسینوما بر حسب درجات مختلف ضایعه، اختلاف تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای مشخص بود ولی بعلت کم بودن تعداد نمونه ها از نظر آماری قابل بررسی نبود و در این رابطه تحقیق دیگری لازم است.

### بحث

در سالهای اخیر مطالعه بر روی نواحی سازمان دهنده هسته ای مورد استقبال بسیاری از پاتولوژیستها قرار گرفته است و بیشتر آنها شمارش نقاط سازمان دهنده هسته ای را برای تشخیص افتراقی هیستولوژیک میان تومورهای خوش خیم و بدخیم و درجه بندی تومورهای بدخیم مفید می دانند. در این مطالعه اختلاف آماری معنی داری میان تومورهای خوش خیم و بدخیم بزاقی، همچنین میان موکوپیدرومئید کارسینوما با پلئومورفیک آدنوما و بافت نرمال و آدنوئید سیستیک کارسینوما با پلئومورفیک آدنوما و بافت نرمال دیده شد ( $P<0/0001$ ). در این رابطه در تحقیق Croker (۱۹۸۷) بر روی ضایعات پوستی نیز مشابه با این تحقیق اختلاف معنی دار میان ضایعات بدخیم با میانگین  $7/9 \pm 1/8$  و دیگر ضایعات خوش خیم پوست با میانگین  $1/21 \pm 0/23$  مشاهده شد ( $P<0/001$ ) که میزان آن در ملانوکارسینوما بیشتر از سایر ضایعات بود<sup>(۱۱)</sup>. در سایر تومورهای پوستی، Egan (۱۹۸۸) نتایج مشابهی را بدست آورد. در این رابطه بازال سل کارسینوما با سایر تومورها اختلاف آماری معنی دار ( $P<0/0001$ ) نشان داد<sup>(۱۲)</sup>. در تحقیقی که توسط Ohno و همکاران (۱۹۹۹) بر روی تومورهای استخوان انجام شد نتایج مشابهی با تحقیق حاضر بدست آمد. در تحقیق فوق اختلاف معنی دار آماری میان تومورهای بدخیم استخوان با

میانگین  $5/85 \pm 1/39$  و تومورهای خوش خیم با میانگین  $2/61 \pm 0/51$  مشاهده شد<sup>(۱۳)</sup> ( $P<0/001$ ). در مورد تومورهای غدد بزاقی نیز در تحقیق Van Heerden (۱۹۹۱) اختلاف معنی دار میان پلئومورفیک آدنوما با میانگین  $0/32 \pm 1/52$  و آدنوئید سیستیک کارسینوما با میانگین  $0/89 \pm 2/83$  مشاهده شد<sup>(۱۴)</sup> که این مسئله با تحقیق حاضر که اختلاف آدنوئید سیستیک کارسینوما با میانگین  $6/78 \pm 0/94$  و پلئومورفیک آدنوما با میانگین  $1/71 \pm 0/51$  از نظر آماری معنی دار می باشد ( $P<0/0001$ ) مطابقت دارد. در مطالعه حاضر میان شمارش Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions در نواحی مجاری و آسینی ها اختلاف معنی دار مشاهده نشد، در این رابطه در مطالعه ای که توسط Landini (۱۹۹۰) انجام شد همین نتیجه بدست آمد<sup>(۹)</sup> در حالیکه در تحقیق انجام شده توسط Shuichi Fujita اختلاف آماری معنی دار ( $P<0/001$ ) میان مجاری و سایر قسمتهای غده بزاقی نرمال مشاهده شد<sup>(۱۵)</sup>.

در مورد پلئومورفیک آدنوما و نماهای هیستولوژیک مختلف آن در تحقیقی که توسط Landini (۱۹۹۰) انجام شد اختلاف آماری معنی داری میان نواحی کندروئید با میانگین  $1/31 \pm 0/09$  و نواحی Solid با میانگین  $2/06 \pm 0/25$  بدست آمد<sup>(۹)</sup> و این با تحقیق حاضر با میانگین  $1/63 \pm 0/22$  برای نواحی کندروئید و  $1/87 \pm 0/2$  برای نواحی Solid مطابقت دارد.

Landini (۱۹۹۰) ذکر کرد که سلولهای نئوپلاستیک در نواحی solid پلئومورفیک آدنوما احتمالاً با امکان ایجاد تغییرات بدخیمی ارتباط مستقیم تری نسبت به نواحی کندروئید دارد. در تحقیق انجام شده توسط Fujita (۱۹۹۲) نواحی solid با میانگین  $1/61 \pm 0/26$  اختلاف معنی دار با سایر نواحی داشتند<sup>(۱۶)</sup> ( $P<0/01$ ).

کارسینوما در تحقیقی که توسط Yamamoto (۱۹۹۵) انجام شد تفاوت آماری معنی داری میان ۳ الگوی هیستولوژیک تومور بدست آمد ( $P < 0/01$ ) که میانگین تعداد نقاط در الگوی Cribriform حداقل و در الگوی Solid حد اکثر بود<sup>(۱۷)</sup>.

در تحقیق حاضر نیز تفاوت آماری معنی دار ( $p < 0/05$ ) میان الگوی Solid با الگوی Cribriform و Tubular وجود داشت.

### نتیجه گیری

در مجموع استفاده از این رنگ آمیزی در اکثر تومورها از جمله لنفوماها، میلوم مولتیپل، تومورهای پوست و تومورهای غدد بزاقی نتایج موفقیت آمیزی داشته است.

در تحقیقی که توسط Comette و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد مشخص شد که میان AgNOR و درجه بندی میکروسکوپی موکوپیدرموئید کارسینوما و همچنین پیش آگهی تومور ارتباط وجود دارد. در مطالعه اخیر به دلیل حجم نمونه کم نتوانستیم آنالیز آماری برای درجه بندی میکروسکوپی انجام دهیم ولی با توجه به میزان بالای نقاط سازمان دهنده هسته ای در grade III می توان نتیجه گرفت که فعالیت پرولیفراتیو در سلولهای اسکواموس بیشتر از سایر انواع می باشد<sup>(۱۷)</sup>. البته ارتباط پیش آگهی با grading و تعداد نقاط سازمان دهنده هسته ای را می توان از روی میزان عود، متاستاز و میزان مرگومیر بیان کرد. بدلیل اینکه پرونده های موجود کامل نبودند انجام این مسئله برای ما میسر نبود. در رابطه با الگوهای هیستولوژیک آدنوئید سیستیک

### References:

- 1- Brad W, Nevile E, Douglas D, Damm E: Oral & Maxillofacial Pathol. 15th Ed. WB Saunders Co. 1995; Chap 11: 336.
- 2- Midion M, Chidzonga VM, Lopezperez M: A clinicopathologic study of parotid gland tumors. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52: 1253- 56
- 3- Yukio I, Toshiharu I: Adenoid cystic carcinoma originated from anterior lingual minor salivary gland: Immunohistochemical and ultrastructural studies and review of literature. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1460- 69
- 4- Jorge A, Ferreira E: Immunohistochemical analysis of salivary gland canalicular adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 761- 65
- 5- Regezi JA, Zarbo RJ: Polymorphous low grade adenocarcinoma of salivary gland. A comparative histologic and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 469- 75
- 6- Xin X, Nordgard S, Tore B: Prognostic significance of nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinomas of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 615-20
- 7- Chomette G, Auriol M: Mucoepidermoid tumors of salivary glands. Histoprognotic value of NORs stained with AgNOR technique. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 130- 32
- 8- Edda AM, Hiroshima N: Correlation between Argyrophilic Nucleolar Organizer Region counts and histologic grades with respect to biologic behavior of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 437- 42

- 9- Landini G: Nucleolar Organizer Regions in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1990; **19**: 257-60
- 10- Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT: Nucleolar Organizer Regions in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**: 436- 40
- 11- Crocker J, Skibeck N: Nucleolar Organizer Region associated proteins in cutaneous melanotic lesion: a quantitative study. *J Clin Pathol* 1987; **40**: 885- 889
- 12- Egan MJ, Crocker J: Nucleolar Organizer Regions in Cutaneous tumors. *J Pathol* 1988; **145**: 247- 53
- 13- Ohno T, Tanaka T: Nucleolar Organizer Regions in Bone Tumors. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999; **272**: 287- 91
- 14- Willie FP, Van Heerden EJ: Evaluation of the Nucleolar Organizer Region associated proteins in minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 1991; **20**: 291- 5
- 15- Fujita S, Takahashi H, Okabe H: Proliferative activity in normal salivary gland pleomorphic adenoma. *Acta Pathol Jpn* 1992; **42**: 573- 78(Abs)
- 16- Fujita S, Takahashi H, Okabe H: Nucleolar Organizer Regions in malignant salivary gland tumors. *Acta Pathol Jpn*. 1992; **42**: 727-33
- 17- Yamamoto Y, Ltoh T: Nucleolar Organizer Region in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Arch Otorhinolaryngol* 1995; **252**: 176- 80