

بررسی مقایسه‌ای تعداد نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای در اسکواموس سل کارسینوما و

وروکوس کارسینومای مخاط دهان با رنگ آمیزی نیترا ت نقره

دکتر سودابه سرگلزائی*، دکتر معصومه احمدنژاد**، دکتر شیما نفرزاده***، دکتر محمد مشرف****

چکیده

سابقه و هدف: کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) مخاط دهان، شایع‌ترین تومور بدخیم دهان می‌باشد که ۹۵٪ از بدخیمی‌های دهان را تشکیل می‌دهد. وروکوس کارسینومای مخاط دهان (VC) شکل منحصر به فردی از کارسینومای دهان، بدون تهاجم به بافت همبند می‌باشد که در برخی موارد شباهت قابل ملاحظه بالینی و بافت‌شناسی با SCC دارد. هدف از انجام این تحقیق، تعیین وجود تفاوت در تعداد نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای بین SCC و VC به روش رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره است تا بدین ترتیب بتوان به روشی برای تشخیص دقیق‌تر VC از SCC دست یافت.

مواد و روشها: مطالعه حاضر یک مطالعه تحلیلی از نوع cross sectional بود. در این مطالعه، تعداد ۲۰ بلوک پارافینی شامل ۱۰ مورد SCC و ۱۰ مورد VC مخاط دهان جمع‌آوری و شمارش تعداد نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای در دو ضایعه توسط میکروسکوپ انجام گرفت. برای مقایسه دو گروه از نظر تعداد نقاط شمرده شده از آزمون غیر پارامتریک Mann - whitney استفاده شد. یافته‌ها: میانگین تعداد نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای در نمونه SCC $2/80 \pm 0/48$ و در نمونه VC $1/95 \pm 0/28$ بدست آمد که در SCC بطور معنی‌داری بالاتر از VC بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای در SCC به طور معنی‌داری بالاتر از تعداد این نقاط در VC است و در نتیجه تکنیک رنگ‌آمیزی می‌تواند برای تشخیص زودهنگام وروکوس کارسینوما از SCC کمک نماید.

کلید واژه‌ها: کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC)، وروکوس کارسینوما (VC)، رنگ آمیزی نیترا ت نقره (AgNor)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۸/۲۴ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۵/۲/۱۰ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۵/۲/۱۱

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ویژه‌نامه (تشخیص - پاتولوژی)، ۱۳۸۶، ۵۷۲-۵۶۸

مقدمه

جراحی رادیکال بوده، با گسترش بیماری از درمانهای رادیوتراپی و یا ترکیبی از رادیوتراپی و جراحی استفاده می‌شود (۱-۳).

پیش‌آگهی SCC وابسته به مرحله‌تمايز تومور (stage) است و میزان بقاء ۵ ساله برای کارسینوم داخل دهانی زمانی که متاستاز رخ نداده است (Stage I و II) ۷۱٪، زمانی که گره‌های لنفاوی درگیر شده باشند (Stage III) ۴۱٪ و زمانی که متاستاز پائین‌تر از کلاویکول باشد (Stage IV) ۹٪ می‌باشد (۱،۲).

کارسینوم سلول سنگفرشی Squamous cell carcinoma (SCC) شایع‌ترین تومور بدخیم در بین تمامی سرطانهای دهان می‌باشد که در حدود ۹۵٪ از بدخیمی‌های این ناحیه را شامل می‌شود. این ضایعه ۳ تا ۴٪ از کل تومورهای بدخیم را تشکیل می‌دهد و ششمین تومور شایع بدخیم در مردان و دوازدهمین تومور بدخیم در زنان است (۱).

درمان SCC داخل دهانی براساس مرحله‌ کلینیکی بیماری و مکان تومور متفاوت است که در مراحل اولیه بیماری به صورت

*نویسنده مسئول: استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. E-mail: ssargolzaei@sbm.ac.ir

**دندانپزشک.

***دستیار تخصصی گروه آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

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

رحیمی و همکاران در سال ۱۳۷۶ نشان دادند که میانگین تعداد نقاط AgNor در ضایعات پیش‌سرطانی با میانگین $۳/۹۴ \pm ۰/۶۴$ بیش از بافت طبیعی با میانگین $۲/۵۴ \pm ۰/۵۱$ ($P < ۰/۰۰۱$) بوده، در سلولهای سرطانی با میانگین $۷/۹۴ \pm ۲/۰۶$ بیش از بافت طبیعی ($P < ۰/۰۰۱$) و در سلولهای سرطانی بیشتر از ضایعات پیش سرطانی ($P < ۰/۰۰۱$) می‌باشند (۱۰).

با توجه به این موارد و از آنجا که در صورت وجود تفاوت در تعداد نقاط AgNor بین دو ضایعه مذکور می‌توان راهی را برای تشخیص افتراقی این ضایعات بیان نمود، این تحقیق با هدف مقایسه تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در SCC و V.C مخاط دهان با رنگ آمیزی نیترا نقره انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه تحلیلی از نوع Cross sectional است. روش و تکنیک این مطالعه، براساس رنگ آمیزی AgNor در برش‌های حاصل از بلوک پارافینی ضایعات SCC و V.C دهان و نمونه‌گیری از نوع نمونه‌گیری آسان از نمونه‌های در دسترس بود.

در این تحقیق ۱۰ بلوک پارافینی از نمونه‌های بافتی SCC مخاط دهان از نوع خوب تمایز یافته و ۱۰ بلوک پارافینی از نمونه‌های بافتی V.C مخاط دهان که از آرشیو بخش‌های پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشکده دندانپزشکی زاهدان و انیستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی جمع‌آوری بودند، مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. بعد از تایید مجدد لام‌های مربوط به SCC و V.C مخاط دهان که با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شده بودند، فرم‌های اطلاعاتی شامل نام بیمار، نام خانوادگی، سن، جنس، محل ضایعه و نام آزمایشگاه پاتولوژی تکمیل شدند. سپس بلوک‌های پارافینی مربوط به هر لام استخراج و پس از

از طرفی وروکوس کارسینومای مخاط دهان (VC) شکل منحصر به فردی از کارسینومای دهان، بدون تهاجم به بافت همبند می‌باشد. V.C به دلیل وجود رشد سطحی و حاشیه‌های کاملاً مشخص به بهترین صورت با جراحی یا با استفاده از لیزر، درمان می‌گردد (۱-۳). متاستاز در V.C یک پدیده نادر است و با درمان جراحی میزان بقاء ۵ ساله بیماران ۹۰٪ بوده (۱)، پیش‌آگهی بیماری خوب است (۱،۲).

اساس تشخیص سرطان‌های مخاط دهان و دیگر سرطان‌ها از ابتدا بر برداشت بیوپسی، رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین و ائوزین و بررسی میکروسکوپی گذاشته شده است ولی به علت وجود اشکال در تشخیص برخی انواع SCC از V.C، بخصوص در مواردی که SCC در مراحل اولیه تهاجم به بافت همبند است یا در مواردی که V.C دیسپلازی نشان می‌دهد و ایجاد مشکل برای پاتولوژیست، پزشک و بیمار، محققین سعی در یافتن روشهای جدید برای تشخیص قطعی نوع بیماری و درجه‌بندی ضایعات نموده‌اند.

اخیراً از نقاط سازمان دهنده هسته‌ای به عنوان شاخصی برای تشخیص سرطانهای مختلف استفاده می‌شود (۳،۴).

نواحی سازمان دهنده هسته‌ای (Nors) حلقه‌ها و قطعاتی از DNA در مرحله اینترفاز در داخل هسته می‌باشند که به وسیله RNA پلی‌مراز I به RNA ریبوزومال (rRNA) ترجمه می‌گردند (۳،۵،۶).

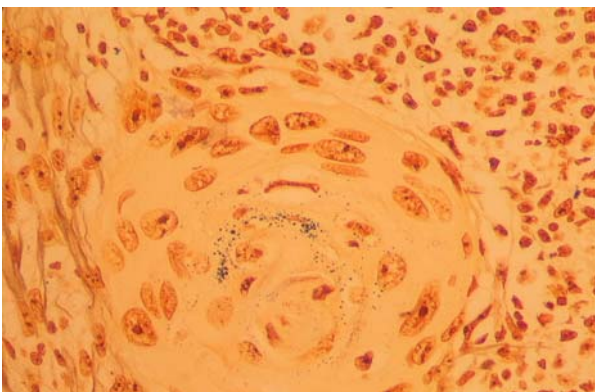
این نواحی به علت تمایل پروتئین‌های تشکیل دهنده آنها به املاح نقره به خوبی با رنگ آمیزی نیترا نقره (AgNor) مشخص می‌شوند (۷،۴). اصلی‌ترین پروتئین در این نواحی نوکلئین می‌باشد (۸).

Warnakulasuriya و همکاران در سال ۱۹۹۳ بیان کردند که متوسط تعداد نقاط AgNor در SCC ($۸/۳۷ \pm ۶/۱۱$) در مقایسه با اپی‌تلیوم دیسپلاستیک ($۵/۶۱ \pm ۴/۶۳$) یا کراتوز خوش خیم ($۴/۵۱ \pm ۲/۵۷$)، بالاتر است (۹).

زن بودند. متوسط سن مبتلایان ۶۷ سال با حداکثر سن ۸۲ سال و حداقل سن ۲۵ سال بود. با بررسی داده‌ها، نتایج زیر بدست آمد:

در ۱۰ مورد از نمونه‌های مورد مطالعه SCC، میانگین تعداد نقاط AgNor $2/80 \pm 0/48$ (بازه ۳/۰۹-۲/۵۱) و در ۱۰ مورد از نمونه‌های مورد مطالعه V.C، میانگین تعداد نقاط AgNor $1/95 \pm 0/28$ (بازه ۲/۱۲-۱/۷۸) بدست آمد که اختلاف معنی‌دار آماری در تعداد نقاط AgNor شمارش شده در دو گروه SCC و V.C وجود داشت ($P < 0/001$).

همچنین نقاط AgNor در نمونه‌های SCC از نظر اندازه کوچکتر بوده ولی دارای پراکندگی و انتشار بیشتری نسبت به نمونه‌های V.C بودند.



شکل ۱- نقاط AgNor در SCC به روش رنگ آمیزی نیترات نقره با بزرگ‌نمایی $\times 1000$

بحث

با توجه به اینکه SCC شایعترین سرطان حفره دهان است، تشخیص افتراقی آن از ضایعات مشابه به خصوص V.C که شباهت کلینیکی و بافتی قابل توجهی به آن داشته و در عین حال درمان کاملاً متفاوتی دارد، برای آسیب‌شناس حائز اهمیت زیادی می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی وجود تفاوت در تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای بین SCC و V.C به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره صورت پذیرفت.

تهیه برش‌های ۵ میکرونی از آنها، رنگ‌آمیزی نیترات نقره طبق روش ploton انجام شد (۱۱). به این ترتیب که نمونه‌ها ابتدا در زایلین پارافین‌گیری شده و سپس به ترتیب به وسیله الکل مطلق، ۹۵٪، ۹۰٪ و ۷۰٪ آب‌گیری شدند. پس از شستشو با آب مقطر، اسلایدها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و محفظه کاملاً تاریک در محلول نیترات نقره قرار گرفتند.

بعد از رنگ‌آمیزی به وسیله نیترات نقره، اسلایدها با آب مقطر شسته شده، سپس مجدداً تحت درجات صعودی الکل و بعد زایلین قرار گرفته، مانع شدند. در مرحله آخر در هر اسلاید تعداد ۲۰۰ عدد سلول با درشت‌نمایی $\times 1000$ عدسی شیئی مورد شمارش قرار گرفتند. این سلولها در SCC از لبه پیشرونده تومور در عمق در یک plan واحد (Single focal plan) و در V.C از یک سوم تحتانی اپی‌تلیوم مورد بررسی و شمارش قرار گرفتند. علت انتخاب این قسمت این بود که در این نواحی میزان نقاط AgNor به دلیل بدخیم بودن این نواحی بیشتر می‌باشد. در هر لام از ناحیه سمت چپ نمونه شمارش آغاز و در محدوده ذکر شده تعداد ۱۰ Field به طور اتفاقی انتخاب شدند. در هر Field نیز ۲۰ عدد سلول به طور اتفاقی انتخاب نقاط قهوه‌ای یا سیاه رنگ داخل هسته‌ها شمارش شدند. نقاط به هم پیوسته و نقاط روی هستک به عنوان یک نقطه محاسبه شدند. نواحی نکروز، آماس شدید، آرتیفکت و کراتینیزاسیون شدید محاسبه نشدند. برای مقایسه دو گروه از نظر تعداد نقاط شمرده شده از آزمون غیرپارامتریک Mann - Whitney استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۰ مورد SCC مورد مطالعه، ۳ مورد مرد و ۷ مورد زن بودند. متوسط سن مبتلایان ۵۵ سال با حداکثر سن ۷۰ سال و حداقل ۳۷ سال بود. از ۱۰ مورد VC مورد مطالعه، ۵ نفر مرد و ۵ نفر

($P < 0/0001$) مشاهده نمودند (۷). بخش دوم این تحقیق به دلیل وجود اختلاف معنی‌دار آماری در متوسط تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای بین V.C و SCC با مطالعه حاضر مطابقت می‌نماید.

در تحقیقی که توسط Yue و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر روی میزان نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در مخاط نرمال دهان به عنوان گروه شاهد و SCC زبان انجام شد، تفاوت معنی‌داری بین تعداد این نقاط در اپی‌تلیوم اسکواموس در گروه شاهد ($1/67 \pm 0/19$) و SCC زبان ($3/58 \pm 1/15$) مشاهده گردید ($P < 0/0001$). همچنین تفاوت معنی‌داری بین Stage‌های I و II بیماری با IV و Stage III بیماری وجود داشت (۴). این تحقیق با تحقیق فعلی از این نظر که بین ضایعه پیش‌سرطانی (V.C) و ضایعه سرطانی (SCC) تفاوت معنی‌دار آماری را نشان داده، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

به دلیل وجود تفاوت معنی‌دار آماری در تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در دو گروه SCC و V.C، تکنیک رنگ‌آمیزی نیتزات نقره می‌تواند به عنوان روشی کمکی در تشخیص این دو ضایعه از یکدیگر مورد استفاده قرار گیرد، گرچه نیاز است برای تعیین حساسیت و ویژگی چنین روشی مطالعه با حجم نمونه بالاتر و با استفاده از آنالیز ROC curve انجام گردد.

References

1. Neville BR, Dam DO, Allen CA, Bouguot JE: Oral and maxillofacial pathology. 2nd Ed. Philadelphia: W.B Saunders Co. 2002; Chap10:356-369.
2. Regezi JO, Sciubba J, Jordan RI: Oral pathology clinical pathologic correlation. 4th Ed. Philadelphia: W.B Saunders Co. 2003; Chaps 2,6:52-62,150-153.
3. Hammer D, Herberhold C, Pfeifer V: Argyrophilic nucleolar organizer region counts in squamous cell carcinomas of the head and neck after irradiation and chemotherapy. Eur Arch Otorhinolaryngol 1998;255:74-76.

در مطالعه Warnakulasyria و همکاران در سال ۱۹۹۳ که بر روی تعداد نقاط AgNor در بافتهای مخاط دهان دارای کراتوز، دیسپلازی و SCC دهان انجام شد (۹)، با اینکه تعداد نقاط AgNor در SCC ($8/37 \pm 6/11$) در مقایسه با اپی‌تلیوم دیسپلاستیک ($5/61 \pm 4/63$) و یا کراتوز خوش‌خیم ($4/51 \pm 2/57$) بالاتر بود ولی به دلیل نزدیکی نتایج، تعداد نقاط AgNor در این مطالعه نتوانست به عنوان مارکر تشخیصی در تمایز بین گروهها عمل نماید.

در تحقیق رحیمی و همکاران در سال ۱۳۷۶ در مورد مقایسه تعداد نقاط AgNor در SCC حنجره با ضایعات پیش‌سرطانی و بافت طبیعی حنجره، نتایج نشان داد که میانگین تعداد نقاط در ضایعات پیش‌سرطانی حنجره ($3/94 \pm 0/64$) بیش از بافت طبیعی ($2/54 \pm 0/51$)، و در ضایعات سرطانی حنجره ($7/94 \pm 2/06$) بیش از ضایعات پیش‌سرطانی حنجره ($P < 0/0001$) می‌باشد (۱۰). این تحقیق از این لحاظ که تفاوت معنی‌دار آماری بین تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در ضایعات پیش‌سرطانی و ضایعات سرطانی وجود داشت، با مطالعه ما شباهت دارد.

در تحقیقی که توسط Xie و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی متوسط تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای (mAgNor) در ضایعات پیش‌سرطانی (اپی‌تلیوم نرمال و دیسپلاستیک) و ضایعات سرطانی (SCC) انجام شد، اختلاف معنی‌داری بین تعداد این نقاط در میان اپی‌تلیوم نرمال و دیسپلاستیک ($P < 0/0003$)، همچنین بین اپی‌تلیوم دیسپلاستیک و SCC

4. Yue L, Iwai M, Furuta I: Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35:70-76.
5. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty R, Mitra R: Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (agnors) in oral carcinomas in relation to human papilloma virus infection and cytogenetics. *J Oral Path Med* 1997;26:310-4.
6. Rajendran R, Nais M: Silver - binding nucleolar organizer regions proteins as a possible prognostic indicator in oral submucous fibrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:487-486.
7. Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M: Diagnostic and prognostic value of nucleolar regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997;79:2200-8.
8. Jozsef P, Agnes B, Dietmar O, Dorte R, Ulrich M, Kurtw R: Standardized agnor staining. Standardized agnor analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1997;182:450-456.
9. Warnakulasuriya K, John RN: Nucleolar organizer region (Nor) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Path Med* 1993;22:77-81.
۱۰. رحیمی - ف، اسلامی - ب: مقایسه نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در کارسینومای سلول فلس دار حنجره با ضایعات پیش سرطانی و بافت طبیعی حنجره. فصلنامه پژوهشی پژوهنده ۱۳۷۶؛ ۳: ۸۷-۹۲.
11. Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Andent J: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18:5-14.