

رابطه اندکس میتوزی و نواحی سازمان‌دهنده هستکی با درجه بدخیمی سرطان سلول ترانزیشنال مثانه

نویسندگان: دکتر محمدرضا جلالی ندوشن^۱، طاهره رضایی نور^۲ و نادر فلاح^۳

۱. دانشیار پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

۲. دانش آموخته پزشکی عمومی دانشگاه شاهد

۳. عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

* نویسنده مسئول مکاتبه: Jalalindooshan@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: TCC دومین سرطان شایع دستگاه ادراری - تناسلی است که پیش‌آگهی و انتخاب نوع درمان آن به عوامل متعدد از جمله فاکتورهای تکثیر سلولی بستگی دارد. در این مطالعه ارتباط میان دو فاکتور تکثیر سلولی: (۱) اندکس میتوزی و (۲) نواحی سازمان‌دهنده هستکی نقره دوست با درجه بدخیمی TCC مثانه مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: ۷۵ بلوک پارافینی بیماران مبتلا طی سال‌های ۱۳۷۹ تا پایان مهرماه ۱۳۸۱ از بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان شهید مصطفی خمینی استخراج و برش‌های ۳ میکرونی از هر کدام تهیه گردید. در یک برش پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H & E)، درجه بدخیمی براساس معیارهای درجه‌بندی WHO/ISUP تعیین و تعداد میتوز در ۱۰۰ سلول تومورال شمارش گردید. در برش دیگر پس از رنگ‌آمیزی تک مرحله‌ای کلونید نقره، تعداد AgNOR در ۱۰۰ سلول تومورال شمارش و میانگین آن در هر سلول معین شد.

یافته‌ها: سرطان‌های با درجه بدخیمی بالا، MI و AgNOR بیش‌تری از سرطان‌های با درجه بدخیمی پایین نشان دادند. ارتباط معنادار میان بدخیمی با MI ($rs=0/801, p=0/000$) و AgNOR ($rs=0/731, p=0/000$) و همچنین بین MI با AgNOR ($rs=0/638, p=0/000$) به‌دست آمد. مدل خطی رگرسیون میان MI با $AgNOR = 1/58 + 0/45 MI$

نتیجه‌گیری: MI و AgNOR با درجه بدخیمی TCC مثانه ارتباط مستقیم دارند، اما از آن‌جا که بررسی آماری ارجحیتی برای AgNOR نشان نداده، می‌توان از MI استفاده کرد. از طرفی با توجه به برقرار بودن مدل خطی رگرسیون میان MI و AgNOR می‌توان با در دست داشتن MI، AgNOR را به صورت تقریبی به‌دست آورد.

واژه‌های کلیدی: سرطان سلول ترانزیشنال مثانه، درجه بدخیمی، اندکس میتوزی، ناحیه سازمان‌دهنده هستکی نقره دوست

دوماهنامه علمی - پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال دوازدهم - شماره ۵۶

اردیبهشت ۱۳۸۴

AgNOR برقرار بود.

مقدمه

سرطان مثانه پنجمین سرطان شایع در ایران [۱] و دومین سرطان شایع دستگاه ادراری - تناسلی است [۲] که در صورت تشخیص زودرس و صحیح و درمان مناسب، طول عمر بیمار را باعث می‌شود. یکی از معیارهای مهم در تعیین نوع درمان، بررسی وضعیت پیش‌آگهی بیمار است. برای تعیین پیش‌آگهی از پارامترهای متعدد آزمایشگاهی و بالینی استفاده می‌گردد. فاکتور شناخته شده‌ای که به‌طور قطع در تعیین پیش‌آگهی اهمیت دارد، درجه بدخیمی میکروسکوپی و بافتی است. همچنین رشد تومور و طول عمر بیمار بستگی به سرعت رشد تومور و تهاجم آن دارد. بر این اساس، قدرت تکثیری تومور و فاکتورهای تکثیر سلولی نیز در تعیین پیش‌آگهی بیماران نقش مهمی دارند. این فاکتورها متعددند و بررسی برخی از آنها نیاز به هزینه و امکانات خاص دارد. یکی از روش‌هایی که طی چندساله اخیر برای بررسی قدرت تکثیر سلولی معرفی گردیده، استفاده از شمارش نواحی سازمان‌دهنده هستکی (NORs) به‌وسیله رنگ‌آمیزی یک مرحله‌ای کلونید نقره است. بر همین اساس در این تحقیق در نظر است، رابطه دو نوع فاکتور تکثیر سلولی AgNOR و MI با درجه بدخیمی TCC که شایع‌ترین نوع سرطان مثانه [۳] است، مورد بررسی قرار گیرد. این مطالعه از این جهت اهمیت دارد که تعیین MI نیاز به هزینه و امکانات خاصی ندارد و در هر جا قابل انجام است؛ اما تعیین AgNOR نیاز به مواد نسبتاً گران قیمت دارد و در صورتی که تعیین این فاکتور، ارتباط مساوی یا کم‌تر از MI با درجه بدخیمی داشته باشد، انجام این تکنیک نسبتاً پرهزینه توصیه نمی‌گردد.

مواد و روش کار

این پژوهش مقطعی روی ۷۵ نمونه بیوپسی TCC مثانه بیماران مبتلا، از بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان شهید مصطفی خمینی که توسط رزکسیون از طریق پیشابراه (TUR) به دست آمده بودند، صورت گرفت. اطلاعات مربوط به سن و جنس بیماران از پرونده آنان استخراج گردید. سپس بلوک‌های پارافینی در برش‌های ۳ میکرونی بریده شد و به‌وسیله روش روتین رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از میکروسکوپ نوری زایس مدل استاندارد ۲۰، درجه بدخیمی براساس معیارهای درجه‌بندی WHO/ISUP (به سه درجه بدخیمی مشخص و جهت تعیین MI، تعداد میتوز در ۱۰۰ سلول تومورال شمارش گردید).

برای تعیین AgNOR هر نمونه، از رنگ‌آمیزی تک مرحله‌ای نقره استفاده شد؛ بدین صورت که بلوک‌های پارافینی که مطابق روش معمول تهیه شده بودند، در برش‌های ۳ میکرونی بریده، شفاف و آگیری شدند و مراحل بعد به ترتیب زیر انجام گرفت:

- ۱- شستشو در آب مقطر دیونیزه
- ۲- قرار گرفتن در محلول رنگ‌آمیزی به مدت ۴۰ دقیقه (محلول رنگ‌آمیزی از حل کردن ژلاتین در اسیدفرمیک آبی ۱ درصد با غلظت ۲ درصد و سپس مخلوط کردن این محلول با نسبت ۱ به ۲ حجمی با محلول آبکی نیترات نقره ۵۰ درصد تهیه گردید).
- ۳- شستشو در آب مقطر دیونیزه
- ۴- شفاف سازی در گزلیل و آگیری در الکل طبق روش معمول
- ۵- چسبانیدن لامل [۴].

نشان داد ($r_s=0/801$, $P=0/000$) و میان AgNOR با درجه بدخیمی نیز ارتباط معناداری وجود داشت ($r_s=0/731$, $P=0/000$). همچنین ارتباط معناداری بین MI با تعداد AgNOR به دست آمد ($P=0/000$, $r_s=0/638$). جهت بررسی مدل آماری بین متغیرهای MI و AgNOR از روش رگرسیون خطی استفاده شد که مدل خطی زیر بین این متغیرها برقرار است:

$$\text{AgNOR} = 1/583 + 0/454 \text{ MI}$$

محل‌های شمارش شده برای NOR، همان مناطق شمارش شده برای میتوز بود که با استفاده از بزرگنمایی $\times 1000$ میکروسکوپ انجام شد. شمارش NOR در 100 سلول صورت گرفت و تعداد متوسط آن در هر سلول محاسبه گردید.

اطلاعات به دست آمده در فرم‌های اطلاعاتی وارد شد و سپس به وسیله روش‌های آماری فراوانی، همبستگی اسپیرمن، U من ویتنی و مدل رگرسیون از طریق نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

این مطالعه بر روی 75 نمونه TCC مثانه بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران در طی سال‌های 81-1379 صورت گرفت که از این تعداد 49 نفر (65/3 درصد) مرد، 26 نفر (34/7 درصد) زن و نسبت فراوانی بیماران مرد به زن 1/88 بود.

میانگین سنی بیماران در کل $56/34 \pm 9$ به دست آمد که کم‌ترین سن 39 و بیش‌ترین آن 80 سال بود. میانگین سنی بیماران مرد برابر با $56/81 \pm 9/18$ بود که کم‌ترین سن 42 و بیش‌ترین سن 80 سال به دست آمد. همچنین میانگین سنی بیماران زن برابر با $55/46 \pm 9$ بود که جوان‌ترین آن‌ها 39 و مسن‌ترینشان 72 سال داشتند. براساس یافته‌های به دست آمده، بیماران با درجه بدخیمی LMP، 14 نفر (18/7 درصد)، با درجه بدخیمی پایین 35 نفر (46/7 درصد) و با درجه بدخیمی بالا 26 نفر (34/7 درصد) بودند.

متوسط MI در هر درجه بدخیمی، به تفکیک در نمودار 1 آمده است.

متوسط AgNOR در هر درجه بدخیمی، در نمودار شماره 2 نشان داده شده است.

آزمون آماری همبستگی اسپیرمن، ارتباط آماری معناداری میان MI با درجه بدخیمی TCC مثانه را

نمودار 1 میانگین اندکس میتوزی در درجات مختلف بدخیمی بیماران مبتلا به کارسینوم سلول ترانزیشنال مثانه

نمودار ۲ میانگین تعداد مناطق سازمان‌دهنده هستکی در هر سلول در کارسینوم سلول ترانزیشنال مثانه

بحث

NORs، حلقه‌هایی از DNA هستند که در اینترفاز سیکل سلولی، داخل هستک قرار دارند و به RNA ریپوزومی ترجمه می‌شوند. NOR در واقع ژن‌های تکرار شونده‌ای است که به‌طور تقریبی ۲۰۰ تا در هر ژنوم انسان وجود دارد. این ژن‌ها در سنتز پروتئین، رشد و تمایز سلولی و احتمالاً تغییر بدخیمی، دخالت دارند. این ناحیه در انجام وظیفه هستک نقش مرکزی دارد. این نواحی در کروموزوم‌های سلول طبیعی محل ثابتی دارند و در سلول‌های سوماتیک انسانی روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های آکروستریک ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ دیده می‌شوند. NORها ابتدا ماهیت شناخته شده‌ای نداشتند، ولی با هیبرید کردن آن‌ها با rRNA نشاندار مشخص شد که rDNA هستند. از این ناحیه به‌عنوان مارکرنسجی جهت نشان دادن پتانسیل تکثیر سلولی ابتدا در سال ۱۹۸۷ توسط کروکر (Crocker) استفاده گردید [۴].

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، هر دو فاکتور تعیین‌کننده پتانسیل تکثیر سلولی (MI، AgNOR) با درجه بدخیمی TCC مثانه، ارتباط مستقیمی دارند. همچنین این دو فاکتور دارای همبستگی مستقیم بالایی هستند.

در مطالعه‌ای که لیپونن و همکارانش (۱۹۹۱) در فنلاند انجام داده‌اند، ارتباط مشخصی بین درجه بدخیمی تومور و مرحله پیشرفت (stage) با MI به‌دست آمده است [۵]. اهمیت این تحقیق از آن جهت است که تعداد بیماران مورد مطالعه ۱۸۷ نفر بوده و برای آنان پیگیری صورت گرفته است. همچنین آنان در تحقیق دیگری در سال ۱۹۹۲ در بررسی فاکتورهای پیش‌آگهی کمی بافتی و بالینی در TCC مثانه، بر

اهمیت فعالیت میتوزی به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور پیش‌آگهی تأکید می‌کند [۶]. علاوه بر این در پژوهش دیگری که لیپونن و همکاران او در سال ۱۹۹۲ در زمینه AgNOR در TCC مثانه در ارتباط با فاکتورهای پیش‌آگهی انجام داده‌اند اعلام داشته‌اند که تومورهای با درجه بدخیمی بالاتر نسبت هسته AgNOR بیش‌تری از تومورهای با درجه بدخیمی پایین داشته، تعداد میتوز به طرز معناداری با تعداد AgNOR مرتبط بوده است [۷]. پژوهش دیگری توسط اسکوپلیتو و همکارانش در سال ۱۹۹۲ در یونان صورت گرفته که تعداد ۵۰ بیمار مبتلا به TCC مثانه را از نظر فاکتورهای تکثیر سلولی و ارتباط آن با درجه بدخیمی مورد بررسی قرار داده است. نتایج این تحقیق نشان داده که افزایش درجه بدخیمی همراه با افزایش تعداد AgNOR است [۸]. این تحقیق از جهت دیگر نیز حائز اهمیت است، بدین توضیح که ارتباط بین AgNOR و مرحله پیشرفت تومور را نیز بررسی کرده و رابطه مستقیمی نیز میان آن‌ها به‌دست آورده است.

شینا و همکارانش در سال ۱۹۹۶ در ژاپن نیز در بررسی AgNOR و محتوای DNA هسته در TCC مثانه می‌گویند که تعداد AgNOR با درجه بدخیمی بافتی مرتبط است [۹].

تحقیق دیگری که توسط آکپولات و همکارانش در سال ۱۹۹۸ روی ۶۴ بیمار در ترکیه انجام شده، ارتباط مستقیمی بین AgNOR و درجه بدخیمی را نشان داده است [۱۰].

در سال ۱۹۹۹ توموبه در ژاپن در پژوهشی که روی ۵۰ بلوک پارافینی TCC مثانه انجام داده به این نتیجه رسیده که شمارش AgNOR ارتباط مستقیمی با درجه بدخیمی دارد. همچنین در پیگیری، بیمارانی که دارای AgNOR کم‌تر بودند، احتمال عود کم‌تری نیز داشتند [۱۱].

منابع

۱. سیاری ع، وضعیت بروز سرطان در ایران در سال ۱۳۷۵. تهران، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۷۸.
2. Amend W, Barbour S, Tanagho EA, Mc Aninch JW. Smith's general urology. New York: Mc Graw-Hill: 2000.
3. Altshuler G, Appelman HD, Sternbeg SS, Antonioli DA. Diagnostic surgical pathology. Philadelphia : Lippincott williams & wilkins: 1999.
۴. جلالی ندوشن م، پایان نامه جهت دریافت دکترای تخصصی در رشته پاتولوژی بررسی مقایسه‌ای شمارش NOR و اندکس میتوزی در تعیین پتانسیل تکثیر تومورهای داخل جمجمه‌ای، تهران، خانم دکتر محمدی ف، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ تهران: ۱۳۷۵-۷۶.
5. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Kiviranta J, Nordling S. Classic Prognostic Factors, Flow Cytometric data, Nuclear Morphometric Variables and Mitotic Indexes as Predictors in Transitional Cell Bladder Cancer. J Anticancer Research 1991; 11:911-916.
6. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R, Hapasaalo H. Independent clinical histological and quantitative prognostic factors in transitional cell bladder tumors with special reference to mitotic frequency. Int J Cancer 1992 January; 51:396-403.
7. Lipponen PK, Eskelinen MJ. Argyrophilic nucleolar organizer regions in Transitional cell bladder tumors related to established prognostic factors, progression and independent prognostic Value. J Oncology 1992; 49:133-138.
8. Skopelitou A, Korkolopoulou P, Papanicolaou A, Panayota C, Thomas Tesaglie E, Pavlakis K. Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen Immunostaining and nucleolar organizer region Staining in transitional cell carcinomas of the urinary Bladder. Eur Urol 1992; 22:235-240.
9. Shinna H, Urakami S, Shirakawa H, Shigeno K, Himeno Y, Mizutani M, Igawa M, Ishibe T. Evaluation of the Argyrophilic nucleolar organizer region, nuclear DNA content and mean nuclear area in Transitional cell carcinoma of bladder using a quantitative image analyzer. European Urology 1996; 29:99-105.
10. Akpolat YS, Bavis Ys, Yilmaz AF, Bakirtas M, Saylik A, Karagoz F, Kandemir B. Cathepsin B, P53 expression and AgNORs in transitional cell carcinoma. Neoplasma 1998; 45:365-368.
11. Tomobe M, Shimasui T, Uchida K, Hinotsu S, Akaza H. Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive Value for local recurrence in superficial bladder tumor. The journal of Urology 1999 July; 162:63-68.

در واقع اگر چه نتایج مطالعه ما در زمینه ارتباط AgNOR و MI با درجه بدخیمی TCC مثنانه با تحقیقات فوق‌الذکر یکسان است، اما نتایج ما از سه جهت حائز اهمیت است:

- ۱- روش تعیین درجه بدخیمی در مطالعه ما WHO/ISUP بوده که آخرین و جدیدترین روش پیشنهادی است، ولی نتایج سایر تحقیقات تاکنون براساس روش‌های درجه‌بندی قبلی از جمله سیستم Ash بوده است.
 - ۲- در مطالعات قبلی که روی AgNOR صورت گرفته، غالباً تعداد بیماران مورد بررسی کم‌تر از تعداد بیماران مورد مطالعه پژوهش ما بوده است.
 - ۳- این پژوهش تنها مطالعه‌ای است که به بررسی مدل خطی رگرسیون میان MI و AgNOR پرداخته و این ارتباط را ثابت کرده است.
- البته نتایج مطالعات لیونن و توموبه از آن‌جا که آنان علاوه بر بررسی‌های میکروسکوپی، بیماران را از جهت میزان بقا و عود نیز مورد پیگیری بالینی قرار داده‌اند، نسبت به پژوهش ما اهمیت بیش‌تری دارد.

نتیجه‌گیری

دو فاکتور تعیین‌کننده پتانسیل تکثیر سلولی MI و AgNOR ارتباط مستقیمی با درجه بدخیمی TCC مثنانه دارند و می‌توانند در تعیین پیش‌آگهی بیماران و همچنین انتخاب نوع درمان مورد استفاده قرار گیرند، اما از آن‌جا که آزمون آماری ارجحیتی برای AgNOR نشان نداد، می‌توان از MI جهت تعیین پیش‌آگهی TCC مثنانه استفاده کرد. از طرفی با توجه به برقرار بودن مدل خطی رگرسیون میان MI و AgNOR می‌توان با در دست داشتن MI، تعداد AgNOR را نیز به صورت تقریبی به دست آورد.