Archive of SID

The Iranian Journal of Oto rhinolaryngology

بررسی ارزش تشخیصی رنگ آمیزی AgNOR در ضایعات نئوپلازیک غدد بزاقی

AgNOR Staining in Neoplastic lesions of Salivary - gland

A. Omidi, M.D., N. Mokhtari, M.D., M. Kalantari, M.D. and N. Eivazi, M.D.

Mashhad University of Medical Sciences

SUMMARY

Background: The aim of our study was to determine the expression of Argyrophilic nucleolar organizer region protein (AgNOR) and mean of AgNOR dots as a marker in differentiation between benign and malignant lesion of salivary glands.

Methods: AgNORs were studied by light microscope in 54 cases of Normal (N = 23). Benign adenoma (n = 15), malignant salivary gland tumor (n = 16).

The investigated parameter included the number of AgNOR dots in nucleoli of one-hundred cells.

Results: A stepwise increase in AgNOR from normal salivary gland tissue to benign adenoma and malignant tumor was found. Mean AgNOR number per cell was 1.6, 2.04, 7.14, respectively.

Conclusion: The AgNOR dots proved to be the valuable diagnostic criterion for the differentiation between benign and malignant salivary gland tumors.

Key words: salivary gland, Neoplasm, AgNOR.

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان مقاله :

بررسی ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR در ضایعات نئوپلازیک غدد بزاقی

نویسندگان :

دکتر عباسعلی امیدی

دانشیار پاتولوژی

دکتر نعمت‌الله مختاری امیرمجدی

استاد گروه گوش و گلو و بینی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

محمودرضا کلانتری

استادیار پاتولوژی

دکتر نسترن عیوضی

رزیدنت گوش و گلو و بینی

مقدمه

در بسیاری از موارد افتراق آزارهای نئوپلازیک غدد بزاقی غیر نئوپلازیک و همچنین افتراق نئوپلاسمهای خوش‌خیم از تومورهای بدخیم در غده بزاقی توسط پاتولوژیستها به‌سادگی و با اطمینان ممکن نیست. در چنین مواردی ضروری است از روشهای دیگری نظیر ارزیابی میزان پرولیفراسیون سلولی استفاده شود.

در سالهای اخیر روشهای متعددی جهت نشان دادن فعالیت هسته برای ارزیابی میزان پرولیفراسیون سلولی معرفی شده‌اند که شامل تعیین پلوئیدی و محتوی DNA هسته توسط فلوسیتومتری و مطالعه Ki-67, P53 و PCNA (آنتی‌ژن هسته‌ای سلول در حال پرولیفراسیون) توسط روشهای ایمنوهیستوشیمی (۱، ۲) و همچنین روشهای مطالعه AgNOR می‌باشند. از این میان رنگ‌آمیزی AgNOR روش ساده، ارزان و دارای صحتی بیشتر از بسیاری روشهای دیگر است (۲، ۳).

هدف ما در این تحقیق ارزیابی توانایی روش ارزان و قابل دسترس رنگ‌آمیزی AgNOR در افراق نئوپلاسمهای خوش‌خیم از بدخیم در غدد بزاقی و همچنین ارزیابی تفاوت پارامترهای AgNOR در ضایعات نئوپلازیک و غده بزاقی غیر نئوپلازیک بوده است.

هستک سلول در جریان میتوز ناپدید می‌شود و دوباره در انتهای مرحله تلوفاز ظاهر می‌گردد. NORs مناطقی از کروماتین می‌باشند که هستک در انتهای مرحله تلوفاز در اطراف آن تشکیل می‌شود (۲۰). در انسان NORs روی بازوی کوتاه کروموزومهای آکروسانتریک یعنی کروموزومهای ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ قرار دارند (۷). توسط روش هیبریداسیون در جا نشان داده شده است که NORs حاوی ژنهایی هستند که RNA ریبوزومی را کد می‌کنند (۲۰ و ۳۰). همچنین NORs حاوی پروتئینهای اسیدی نقره‌دوست هستند که دو پروتئین اصلی آن، پروتئین C23 یا نوکلئولین (Nucleolin) و پروتئین B23 یا نماترین (Nematrin) می‌باشند. چون مولکولهای RNA محل اصلی سنتز پروتئین هستند، پیشنهاد شده است که تعداد و ویژگیهای NORs ممکن است منعکس‌کننده فعالیت هسته‌ای و سلولی باشند (۲، ۵، ۴) و این نواحی بخاطر وجود پروتئینهای نقره‌دوست به‌طور واضح توسط رنگ‌آمیزی نیترات نقره با اسید فرمیک یا آمونیاک رنگ می‌گیرند (۲، ۶). پلوتون و همکارانش برای اولین‌بار روش AgNOR را برای بلوکهای پارافینی فیکس شده در فرمالین ابداع کردند و سپس کروکر (Crocker) کاربرد این روش را در تشخیص پاتولوژی تومورها گزارش نموده است (۲۰).

مواد و روشها

نمونه‌ها: ۵۴ نمونه بلوک پارافینی شامل ۲۳ نمونه غده بزاقی در حد طبیعی، ۱۵ نمونه آدنوم و ۱۶ نمونه کارسینوم غده بزاقی از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان قائم (عج) جمع‌آوری شدند و همه نمونه‌ها مجدداً بازبینی شدند.

از هر بلوک ۲ اسلاید میکروسکوپی به‌ضخامت ۴ میکرون تهیه که یکی به‌روش H & E و دیگری به‌روش AgNOR، رنگ‌آمیزی شد.

روش رنگ‌آمیزی: ۱- برشهای بافتی به‌ضخامت ۴ میکرون از بلوکهای پارافینی تهیه شد.

۲- لامها در گزیلن دپارافینه شدند.

۳- با محلول اتانول و آب مقطر هیدراته شدند.

۴- محلول رنگ‌آمیزی AgNOR تازه تهیه شده روی لامها ریخته شد.

۵- لامها به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند.

۶- با آب مقطر شستشو شدند.

۷- به‌ترتیب در الکل ۷۰٪، ۹۶٪ و مطلق هریک به‌مدت دو دقیقه آبگیری شده و در هوا خشک شدند.

طرز تهیه محلول رنگ‌آمیزی AgNOR:

۱- ۵۰ گرم نیترات نقره را در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر

www.SID.ir

Archive of SID

حل می‌کنیم.

۲- دو گرم پودر ژلاتین را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل نموده، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فرمیک غلیظ به‌آن اضافه می‌کنیم.

۳- ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول شماره (۱) را با ml ۵۰ از محلول‌شماره (۲) مخلوط کرده‌بلافاصله بر روی اسلایدها می‌ریزیم.

روش ارزیابی: پس از رنگ‌آمیزی، نواحی NOR به‌صورت نقاط سیاه مشخص داخل هسته‌ای نمایان می‌شوند و هسته‌ها رنگ قهوه‌ای روشن را به‌خود می‌گیرند. اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ X با روغن ایمرسیون مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر نمونه یکصد سلول اپیتلیال به‌طور مجاورتی انتخاب شده و به‌صورت double blind (بدون اطلاع از نتیجه H & E و توسط فرد غیرپاتولوژیست) شمارش شد.

نتایج

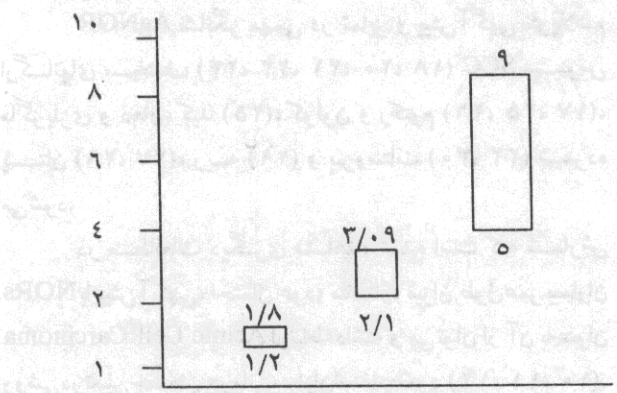
تعداد متوسط و دامنه تغییرات میانگین تعداد نقاط AgNOR در گروههای تشخیصی مختلف بتدریج افزایش یافته‌که در جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. همچنان که مشاهده می‌شود که هیچ‌گونه همپوشانی در تعداد نقاط AgNOR در نمونه‌های نرمال، خوش‌خیم و بدخیم وجود ندارد.

برای مقایسه و ارزشیابی تعداد متوسط نقاط AgNOR در غده بزاقی نرمال، آدنوم و کارسینومهای غده بزاقی از آزمون t استفاده شد که با $P < 0.05$ اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

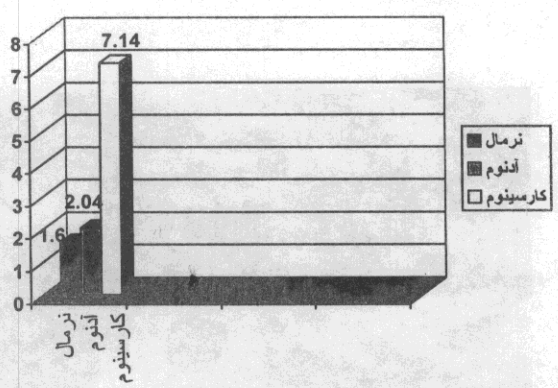
نقاط AgNOR در غده بزاقی نرمال، کوچک و با حاشیه منظم و هم‌شکل بودند (شکل ۱) و در آدنوم کمی بزرگتر (شکل ۲) و در موارد بدخیم، بزرگ و نامنظم و پلئومورف بودند (شکل ۳).

جدول ۱- میانگین تعداد نقاط AgNOR و دامنه تغییرات آن در گرههای تشخیصی مورد مطالعه در غده بزاقی

گروه تشخیص	تعداد موارد	تعداد سلول شمارش شده در هر مورد	دامنه تغییرات میانگین تعداد AgNOR	متوسط تعداد نقاط AgNOR
نرمال	۲۳	۱۰۰	۱/۲-۱/۸	۱/۶
آدنوم	۱۵	۱۰۰	۲/۱-۳/۰۹	۲/۰۴
کارسینوم	۱۶	۱۰۰	۵-۹	۷/۱۴



نمودار ۱- دامنه تغییرات میانگین تعداد نقاط AgNOR در سه گروه تشخیصی مورد مطاله در غده بزاقی



نمودار ۲- متوسط تعداد نقاط AgNOR در سه گروه تشخیص مورد مطالعه در غده بزاقی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به‌این که بعضاً افتراق بین نئوپلاسمهای خوش‌خیم از بدخیم در غده بزاقی یکی از مشکلات تشخیصی پاتولوژیستها را تشکیل می‌دهد، تاکنون پژوهشگران تلاشهای بسیاری را به‌کار بسته‌اند تا این مشکل را برطرف سازند (۱۵ و ۱۴ و ۱۳). در چنین مواردی استفاده از روشهای تشخیصی اضافی شامل فلوسیتومتری، ایمنوهیستوشیمی و رنگ‌آمیزی AgNOR ضروری به‌نظر می‌رسد که مورد اخیر روش ساده ارزان و در دسترس است.

تعداد نقاط AgNOR با سرعت رشد تومور و با سرعت تکثیر سلولی مرتبط است (۱۶، ۲۰). و تعداد متوسط AgNOR در ۱۰۰ سلول منعکس‌کننده DNA ploidy است (۲۰).

علل افزایش تعداد AgNOR قابل مشاهده در هسته در سلولهای نئوپلازیک عبارت است از:

۱ - افزایش تقاضا برای بیوژنز ریبوزومی که مشخصه سلولهای در حال تقسیم است. در این حالت نوکلئول باز شده و منجر به‌قابل مشاهده شدن AgNOR های منفردی که قبلاً متراکم بودند می‌شود (۲۰).

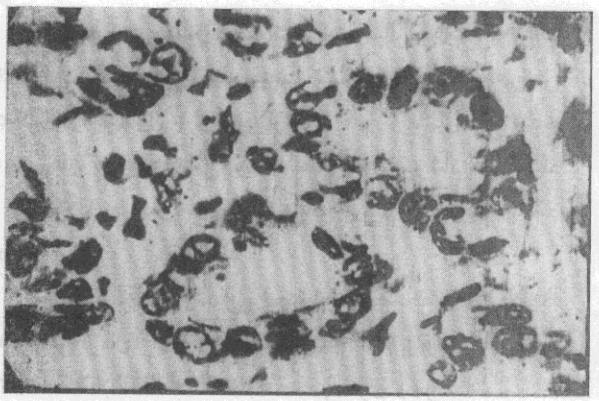
۲ - افزایش تعداد کروموزومهای آکروسانتریک حامل NOR که با افزایش تعداد کلی کروموزومها مرتبط است. حضور مقادیر بالای NOR اینترفاز در سلولهای سرطانی ممکن است نتیجه حالت هیپردیپلوئیدی باشد، در واقع هیپردیپلوئیدی شایعترین تغییر در تعداد کروموزومهای سلولهای بدخیم است (۲۰).

۳ - مطالعات مختلف نشان دادند که حالت تقسیم مداوم ممکن است مسئول تعداد بیشتر AgNOR اینترفاز باشد. تعداد AgNOR به‌طور پیشرونده، از فاز G1 به S افزایش می‌یابد (۲۰).

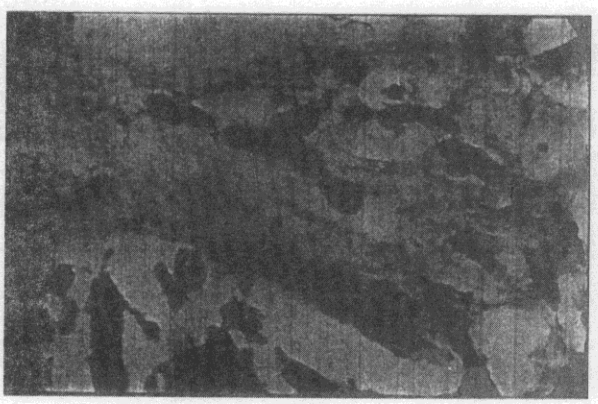
AgNOR نشانگر مهمی در تمایز و پیش‌آگهی نئوپلاسم ارگانهای مختلف (۲۴، ۲۳، ۲۱، ۲۰، ۱۸) SCC سینوس ماگزیلری و دهان، کبد (۲۵)، کولون و رکتوم (۲۶، ۲۵، ۱۷)، پستان (۲۸، ۲۷)، ریه (۲۹) و پروستات (۳۰، ۲۲) شمرده می‌شود.

در مطالعات دیگری مشاهده شده است که شمارش NORs با پیش‌آگهی، احتمال عود، متاستاز، میزان طول‌عمر بیماران Acinic Cell Carcinoma ارتباط داشته و می‌توان از آن به‌عنوان روشی در تعیین خط‌مشی درمانی بیماران استفاده نمود (۱۲، ۱۱، ۱۰).

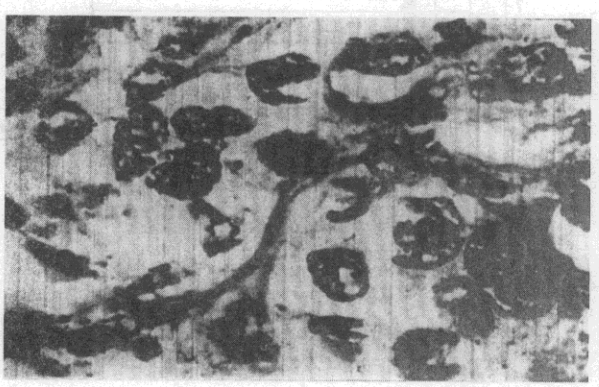
در مطالعه ما تعداد نقاط AgNOR هستکی در آدنوم غده بزاقی ۲/۵ - ۲ برابر بافت طبیعی و در کارسینوم غده بزاقی ۶ - ۳ برابر بافت طبیعی بوده و از نظر مورفولوژی AgNORs



شکل ۱ - نمای میکروسکوپی غده بزاقی نرمال



شکل ۲ - نمای میکروسکوپی آدنوم پلئومورف غده بزاقی



شکل ۳ - نمای میکروسکوپی بدخیمی غده بزاقی

www.SID.ir

Archive of SID

در کارسینومهای غده بزاقی بزرگتر و نامنظم‌ترند.

مطالعات سایر پژوهشگران نیز بررسی ما را در رابطه با نئوپلاسمهای غده بزاقی تأیید نموده‌اند. بنابراین به‌نظر می‌رسد رنگ‌آمیزی AgNOR تکنیکی ساده، ارزان، در دسترس و با صحتی قابل قبول در افتراق بین نئوپلاسمهای خوش‌خیم و بدخیم غدد بزاقی باشد.

خلاصه

اهداف تحقیق: هدف از این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNoR (Argyrophilic nucleolar organizer region) درافتراق‌بین‌نئوپلاسمهای‌خوش‌خیم‌و بدخیم‌غدد بزاقی‌است.

روش کار: تعداد متوسط نقاط AgNOR در هسته ۱۰۰ سلول در ۲۳ نمونه غده بزاقی، ۱۵ نمونه آدنوم خوش‌خیم، ۱۶ نمونه تومورهای بدخیم غده بزاقی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: تعداد متوسط نقاط AgNOR هستکی در غده بزاقی طبیعی، آدنوم خوش‌خیم و نئوپلاسمهای بدخیم به‌تدریج از ۱/۶ به ۲/۰۴ و ۷/۱۴ افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: بررسی مناطق رنگ‌پذیر هستکی AgNOR دارای ارزش تشخیصی بالایی در تمایز نئوپلاسمهای غدد بزاقی از یکدیگر است.

کلمات کلیدی: غدد بزاقی، نئوپلاسم، AgNOR

REFERENCES

1. Munakata - S, et al. A multilabelling technique for simulantaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and AgNoR as in praffin embedded tissue, J-Histochem-cytoshem, 1994 Jun: 42(6): 789-3.
2. Martin - H, Importance of AgNoR analysis in Malignant tumors, Zentralbl - Pathol, 1994 Mar; 140(1): 15-22
3. Derenzini - M, et al AgNoR proteins as a parameter of the repidity of cel proliferation, Zentralbl - Pathol, 1994 Mar; 140(1): 7-10.
4. Rusell - D.LEEK et al, Variations in the occurance of silver - staning Nucleolar Orgnizer Region in Non - Proliferating and proliferating lesion, J-Pathol, 1991. (43-51).
5. Ronco - A, et al, AgNoR and breast cancer, Histol - Histopathol, 19943 Apr. 9(2): 309-13.
6. David - T, et al, AgNoR area in interphase nuclei of human tumors correlate with the proliferative activity evaluated by Bromodeoxy uridine labelling and Ki-67 immunostraining, J - Pathol., 1991, 165, (53, 59).
7. Engel - U, et al, AgNoR as in primary and recent gliomas, a retrospective study, Zentralbl - Pathol., 1994 Mar. 140(1): 73-81.
8. Ishii - K, et al, Evalution of malignant grade of sailvary gland tumors, Pathol - Int - 1994 Apr: 44(4): 287-96.
9. Vuhahula - EA, et al, Prognostic value of Agnor count in adenoid cystic carcinoma of salivary gland, pathol - Int., 1994 May: 44(5): 368-73.
10. Timon - CL, et al Acinic cell carcinoma of salivary gland, Arch Otolaryngol - Head - Neck - surg., 1994 Jul; 120(7); 727-33.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Timon, CT: Dardick, I (The important of dedifferentiation in recurrent aeinic cell carcinoma): J larynaqol Otol; 115(8) 639-66 2001 aug.
12. Vuhahula EA, Nikai H, Oqawa I, Miyauchi M, Takata T, I to H, Itor.
correlation between argyrophilic rucleolar organizerrewion (Agnor) counts and histologic grades with repect to biologic behavior of saivary aderoid cystic carcinoma:
Joral Pathol Med. 24: 437-42, 1995 NOV.
13. Rosai J Ackerman's sugical pathology 8th ed mosby U.S.A 1221-1246, 1996.
14. Virginia A, montane L, Sack M in "diagnostic surgical pathology", sternberge sterphens, third et Lippincott williams & willkins. U.S.A. 545-547, 1999.
15. David C, Bostwich in "Anderson's Pathology; (Damjanov) 10th ed, Mosby U.S.A. 2203-2222, 1996.
16. Drenzini M, Trere D, Pession A, et al; nucleolar Size indicates the repidity of cell prolifration in cancer tissue J.Path 1991(2): 181-6, 2000.
17. Eminovic - Behrem S, Trobonjaca Z, Petroveki. M et al; Prognostic significant of DNA poidy pattern and nucleolar organizer region in colorectal carcinoma croat Med 41(2): 154-8, 2000.
18. Zaczek marcin, Szot wojciech, chlap zbigniew; argirophilic nucleolar organizer regions in prolifrative lesion of the thyroid coland Anal ouant cytol histor 18(1), 1-8, 1996.
19. Ruschoff J, Prasser C, Cortez T; Diagnostic value of AgNoR staining in follicular cell neoplsm of the thyroid A.J. Sugical Pth. 17(2): 1281-1288, 1993.
20. Derenzini M, sirri V, Trere D; Nucleolar organizer regions in tumor cells the cancer Journal volum 7, N 2, 1-9, 1994.
21. Kavasaki F, Onoda N, Ishikawat et al; Evaluation of (AgNoR) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence oncol Re 7(4), 853-7, 2000.
22. AgNoRas in atypoical adenomatose hyperplasia, Prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma mukherjee J, Misra V, Guptase et al. Urol int 58(2): 75-9, 1997.
23. Montrioni R, Braccischi A, Scarpelli M, eatl; value of quantitative nucleolar feutures in the preoprative - cytological diagnosis of follicular neoplasias of the thyroid. J. Clin pathol. 44; 509-14, 1991.
24. Musiatowicz B, DZ, Eciol J, Augusty nowicz A; Over ezplanation of the nucleolar organizer Region in the thyroid follicular thumours, Rocznik Akademii Medczej W Bialymstoku 1998, Vol 43, 186-193.
25. Jain R, Malhorta V. Kumar N et al; Nucleolar organizer regions in cirrhosis and hepatocellolar carcinoma Trop Gastroentrol. 19(3): 100-1, 1998.
26. Kaneco M, Anhiro K, Fuji S et al; the proliferative activity in epithelial hyperplasia of the breast. 221: 46-51, 1995.
27. Ogava Y, Chung YS, Nakta B et al; Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in breast cancer ann Cancer Res Ther 3: 109-112, 1993.
28. Ceccarelli C, Trere D, Santini D et al; Angoras in Breast tumor Micron 31(2); 143-9, 2000.
29. Mourad V.A, Vallieres E, Chuen J et al; cell kinetics Analysis of surgical Resected nonsmall lung cancer Ann saudi med. 1997; 17(2): 161-166.
30. Bollicelli A.R., Marandilap, Jallush et al; Quantitative and quaitative Angoras rate of prostatic cancer pathologica 87, 627-630, 1995.

www.SID.ir