Archive of SID

The Iranian Journal of
Otorhinolaryngology
Vol .17,No. 40 ,Summer -2005

مجله گوش،گلو، بینی وحنجره ایران،
سال هفدهم، شماره چهل، تابستان ۱۳۸۴

بررسی مقایسه ای رنگ آمیزی AgNOR در مخاط نرمال، کارسینوم زگیلی و کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان

دکترنوشین محتشم[۱]، دکتر نوریه شریفی[۲]، دکتر شادی ثقفی[۳]، دکترکامبیزکامیاب[۴]، دکترمحمدتقی شاکری[۵]

[۱،۲،۳] استادیارپاتولوژی، [۴]پاتولوژیست، [۵]استادیار پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

مقدمه: ارزش رنگ آمیزی نقاط نقره دوست هستکی AgNOR به عنوان روش تشخیصی در ضایعات تومورال متعدد به اثبات رسیده است هدف از این مطالعه ارزیابی میزان AgNOR به عنوان یک مارکر پرولیفراتیو در کارسینوم سلول سنگفرشی درجه ۱ (کارسینوم زگیلی) و مخاط نرمال دهان است.

مواد وروش کار: نقاط نقره دوست داخل هستکی AgNOR در برش های تهیه شده ازبلوک های پارافینی ۲۰ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی خوب دیفرانسیه ، ۲۰ مورد کارسینوم زگیلی و ۱۰ مورد مخاط نرمال دهان شمارش شده است. میانگین تعداد AgNOR در هسته به عنوان نشانگر فعالیت پرولیفراتیو سلول ها مورد بررسی قرار گرفته اند.

نتیجه گیری : رنگ آمیزی (Argyrophilic nucleolar organizer region) (AgNOR)یک روش کمی ، آسان و مفید در پاتولوژی تشخیصی و افتراقی و برآورد اولیه فعالیت رشدی وتکثیری ضایعات تومورال می باشد.در این مطالعه اختلاف آماری بین مخاط نرمال دهانی کارسینوم زگیلی و کارسینوم سلول سنگفرشی خوب دیفرانسیه از نظر پارامترهای مرتبط با AgNOR مشاهده شد.

واژه های کلیدی : نقاط نقره دوست داخل هستکی ،کارسینوم زگیلی ،کارسینوم سلول سنگفرشی ،مخاط دهان

مقدمه

کارسینوم زگیلی حفره دهان اولین بار توسط Fried ell وRosenthalدرسال ۱۹۴۱ شرح داده شد، سپس توسط Ackermanبه عنوان Ackerman Tumor(۱) به صورت توموری با قدرت تهاجمی موضعی بدون توانایی ایجاد متاستاز دور دست در سال ۱۹۴۸ معرفی گردید(۲). این نئوپلاسم که فرم خاصی از کارسینوم سلول سنگفرشی محسوب می شود، به علت رفتار بالینی و نمای مورفولوژیک اختصاصی آن مورد توجه خاص محافل پاتولوژی و بیماری های دهانی می باشد(۳،۴،۵).

دکترنوشین محتشم
آدرس: مشهد بلوار وکیل آباد، دانشکده دندانپزشکی
Email: N, Mohtasham@ mums. ac.ir
تاریخ وصول :۸۳/۴/۱۷ تاریخ تایید: ۸۳/۹/۲۲

www.SID.ir

Archive of SID

به خصوص که حفره دهان محل کلاسیک و شایع این تومور محسوب می شود و ارتباط خاصی بین مصرف تنباکو و ناس و بروزاین تومورگزارش می شود(.۸،۷،۶).

کارسینوم زگیلی حدود ۵٪ کانسرهای حفره دهان را به خود اختصاص می دهد و وجه تسمیه بالینی آن نمای مشخص زگیلی و برجسته آن در بررسی ماکروسکپی و میکروسکپی است از آن جا که قدرت تهاجمی موضعی متاستاز لنفاوی بی نهایت نادر جزو خواص سرشتی این تومور می باشند ،درمان آن رزکسیون کامل بدون رادیوتراپی است (۶،۸).

تشخیص افتراقی آن از کارسینوم سلول سنگفرشی خوب دیفرانسیه بسیار مهم و حیاتی است از سوی دیگر با توجه به نمای مورفولوژیک میکروسکپی کاملا دیفرانسیه وتمایزیافته وروکوزکارسینوما تشخیص هیستوپاتولوژیک و افتراق از کارسینوم سلول سنگفرشی خوب دیفرانسیه به خصوص در بیوپسی های کوچک و سطحی بسیار مشکل و گاه غیر ممکن است(۹).

به همین علت روش های ایمنوهیستوشیمی و مولکولار متعددی برای افتراق این دو ضایعه به کار رفته است. در یک مطالعه میزان و نحوه بروزE-Cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی بررسی شده است که در S.C.C grading و افتراق S.C.C خوب دیفرانسیه از کارسینوم زگیلی مفید بوده است، همچنین میزان بروز آن و دست اندازی به بافت های مجاور ومتاستاز به غدد لنفاوی را نیز پیش گویی کرده است(۱۰).

در یک مطالعه تغییرات کروموزومی و از دست دادن هتروزیگوسیتی(L.O.H)S.C.C,در کارسینوم زگیلی و دیسپلازی شدید بررسی شده وطبق آن کارسینوم زگیلی شبیه دیسپلازی شدید بوده و متفاوت از هیپرپلازی و S.C.C می باشد (۱۱).

در یک بررسی بروز $Cyclin\ D_1$ به میزان ۳۵٪ در کارسینوم زگیلی و به میزا ن ۱۰۰٪ در S.C.C خوب دیفرانسیه مشاهده شده است (۱۲).

با یادآوری موارد فوق بر آن شدیم تا با بهره گیری از تکنیک رنگ آمیزی AgNOR و توانایی آن در نشان دادن فعالیت پرولیفراتیو سلولی وباتوجه به مطالعات جالبی که در زمینه بیماری های دهان با متد AgNOR انجام شده(۱۲،۱۱،۱۰)، ضمن بررسی موارد وروکوز کارسینوم و کارسینوم سلول سنگفرشی موجود در بخش آسیب شناسی نسبت به رنگ آمیزی آن ها به روش AgNOR اقدام و نتایج بررسی را در جهت تفکیک ضایعات نئوپلازیک فوق اعلام نماییم.

مواد و روش کار

۵۰ نمونه بلوک پارافین بخش پاتولوژی بیمارستان قائم و دانشکده دندان پزشکی شامل ۱۰ نمونه مخاط نرمال دهانی ، ۲۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی درجه I ، ۲۰ نمونه کارسینوم زگیلی حفره دهان انتخاب شدند و پس از بازبینی اسلایدها از هر بلوک دو برش به ضخامت ۴ میکرون تهیه و به روش H&E و AgNOR رنگ آمیزی شدند. پس از پارافین گیری اسلایدها و هیدراته نمودن آنها محلول تازه AgNOR بر روی اسلایدها ریخته و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده ایم و پس از رنگ آمیزی زمینه با Neutral Red و قراردادن در گزیلل و استفاده از چسب آنتلان اسلایدها مورد بررسی میکروسکپی قرار گرفتند.

یکصد سلول از تمام نمونه های مخاط نرمال ، کارسینوم سلول سنگفرشی درجه I و کارسینوم زگیلی حفره دهان بروش تصادفی (Random) انتخاب و با درشت نمایی ۱۰۰۰ نقاط AgNOR شمارش شد وجهت بررسی Distribution score یکصد سلول ازتمام نمونه های فوق الذکر انتخاب و سلول هایی که ۳ عدد یا بیشتر نقطه AgNOR داشتند شمارش و درصد سلول های ذکر شده محاسبه شدند.

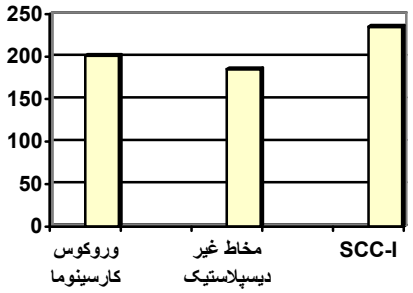
www.SID.ir

Archive of SID

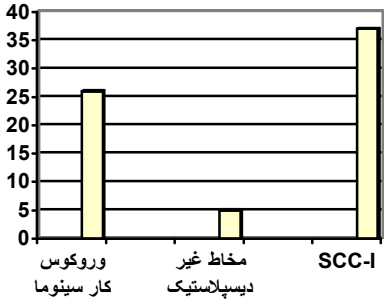
جهت ارزیابی آماری اطلاعات به دست آمده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد و برای مقایسه های چندگانه از آزمون توکی و HSD برای مقایسه های دوگانه استفاده شده برای اطمینان از نتایج به دست آمده از آزمون های پارامتری معادل استفاده شد که نتایج با این روش هم تائید گردید.

نتایج

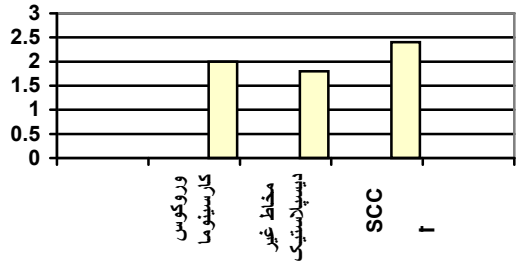
دامنه و میانگین نقاط شمارش شده AgNOR در یکصد سلول به روش تصادفی و تعیین Distribution score در یکصد عدد سلول که ۳ نقطه یا بیشتر داشته اند در ۱۰ مورد مخاط نرمال دهان و ۲۰ مورد کارسینوم زگیلی و ۲۰ مورد سرطان سلول سنگفرشی درجه یک انجام و نتایج آن به شرح ذیل اعلام می شود (نمودار ۱،۲،۳).



نمودار ۱- تعداد نقاط شمارش شده در هر سلول



نمودار۲- درصد تعداد سلول های با سه نقطه یا بیشتر



نمودار۳- میانگین تعداد نقاط در هر سلول

بحث و نتیجه گیری

کارسینوم زگیلی حفره دهان توموری بدخیم با قدرت تهاجم موضعی بدون توانایی متاستاز می باشد که ۵٪ کانسرهای دهان را به خود اختصاص می دهد. شایعترین محل آن در حفره دهان، مخاط گونه و لثه تحتانی می باشد (۷،۶). درجنس مذکر شایعتر و اغلب درسنین حدود ۷۰ – ۶۰ سالگی دیده می شود(۷).

شایعترین علامت کلینیکی آن درد، سفتی، زخم دهانی و اختلال در عمل جویدن می باشند. ارتباط بروز کارسینوم زگیلی در دهان و مصرف تنباکو از مدت ها پیش مورد بررسی است و امروزه این وابستگی و ارتباط به خصوص در مورد استفاده از تنباکو جویدنی و ناس در اکثریت بیماران ثابت شده است(۸).

مصرف سیگار و تنباکو به مدت طولانی از عوامل اتیولوژیک آن می باشد(۸) نقش الکل به عنوان عامل سببی ماژور این تومور تائید نشده است.

برخی مطالعات مولکولی حضور DNA ویروس پاپیلومای انسانی(HPV)،تایپ های(۱۶،۱۸،۳۱،۳۳،۳۵) رادر کارسینوم زگیلی لارنکس وسرویکس نشان داده اند (۱۶،۱۷ ،۵).از نظر بالینی کارسینوم زگیلی معمولا به صورت توده ندولر با حد مشخص و برجسته با سطح زگیلی و یا صاف تظاهر می کند که بر اساس درجه دیفرانسیاسیون ممکن است سفید ، قرمزو یا مخلوطی از این دو رنگ باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی هیستوپاتولوژیک تومور متشکل از اپی تلیوم خوب دیفرانسیه سنگفرشی هیپرپلازیک با رشد رو به بالاو پایین (upward, downward) است که سطح برجسته آن معمولا پوشیده از توده های کراتینی اورتو و پاراکراتوتیک است.بخش رشدرو به پائین تومور معمولا پهن و کند با مارژین فشارنده (pushing) است.

آتیپی سیتولوژیک حداقل است مگردر مواردی که تومور تحریک شده و دچار التهاب شود. Medina و همکاران مواردی از وروکوز کارسینوما باکانون هایی از کارسینوم سلول سنگفرشی با حاشیه انفیلتراتیو در۲۰٪ از ۱۰۴ بیمار مورد بررسی با کارسینوم زگیلی دهان گزارش کرده اند(۷).

بزرگی غدد لنفاوی مجاور این تومور دیده می شود که نباید با درگیری متاستاتیک اشتباه شود. تشخیص افتراقی کارسینوم زگیلی دهان با پرولیفراسیون های خوش خیم و بدخیم سلول ها ی سنگفرشی شامل پاپیلوما، کراتوآکانتوما، پسودواپیتلیوماتوز هیپرپلازی و لکوپلاکیا و از همه مهم تر کارسینوم سلول سنگفرشی با نمای پاپیلری و دیسپلازی هیپرکراتوتیک در حفره دهان است.گرچه توجه به کلینیک بیمار و بررسی دقیق هیستوپاتولوژیک تا حدودی در افتراق موارد مطرح شده کمک کننده است اما گاه تصمیم گیری قاطع در مورد تشخیص کارسینوم زگیلی، SCC گرید I و دیسپلازی هیپرکراتوتیک بسیار مشکل و یا غیر ممکن است . به خصوص این که اکسزیون جراحی بدون رادیاسیون (۹۴ ،۸۲٪)سبب کنترل وروکوز کارسینوما خواهد شد در حالی که رادیوتراپی موجب پیدایش رفتار تهاجمی و متاستاز لنفاوی آن می شود(۱۰).

با مسائل مطرح شده و مشکلات تشخیصی که درتفکیک کارسینوم زگیلی باضایعات دیگر حفره دهان مطرح است به نظر می رسد تکنیک AgNOR به عنوان راه گشایی در معضلات تشخیصی فوق الذکر باشد.

NOR مناطقی از کروماتین هسته می باشند که هستک در اطراف آنها تشکیل می شود و حاوی ژن های کد کننده RNA ریبوزومی می باشند تعداد AgNOR با سرعت رشد سلولی و تومور ارتباط مستقیم دارد ، تعداد متوسط آن در سلول منعکس کننده DNA ploidy است. این روش نوین در سال های اخیرجهت برآورد فعالیت تکثیری سلول های نئوپلازیک در بافت های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است، این روش ساده و قابل اعتماد در مطالعات متعددی در مورد افتراق ضایعات خوش خیم و بدخیم دهان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳،۱۵،۱۸،۱۹).

در یک مطالعه انجام شده کمیت AgNORسلول های اپی تلیوم مجاور SCC های حفره دهان و مخاط نرمال بررسی شده که نتایج آن اختلاف آماری مشخص در Mean AgNOR گروه های مورد بررسی را نشان می دهد (۲۰).

مطالعه دیگر بررسی کمی AgNOR در هیپرپلازی پسودوکارسینوماتوز مخاط دهان و SCC با درجه بندی متفاوت حفره دهان بوده است که نتایج اختلاف مشخص میزان AgNOR سلول ها را بین کارسینوم سلول سنگفرشی و هیپرپلازی پسودواپی- تلیوماتوز نشان داده است. در چند مطالعه افزایش فعالیت پرولیفراتیو سلولی به کمک تهیه اسمیر از مخاط دهان افراد سیگاری و الکلی و رنگ آمیزی AgNOR مشاهده شد (۱۳،۲۱). علاوه بر آن بررسی مخاط دهانی نرمال، دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی با تعیین کمی میانگین AgNOR اختلاف معنی دار و واضحی بین گروه های مورد بررسی نشان داده شده اما به علت همپوشانی داخل گروهی این مطالعه ارزش تشخیصی عملیAgNOR در افتراق عناوین ذکر شده مورد تردید گزارش شده است (۱۵،۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

به عقیده اکثر مولفین از آنجا که رنگ آمیزیAgNOR وابسته به تکنیک بوده و پارامترهای متعددی در نتایج حاصل از آن می تواند مؤثر باشند آنالیز تصویری کامپیوتری ، تکنیک های مورفومتریک که تغییرات حجم، شکل و توزیع AgNOR سلول ها را دقیق تر نشان دهد مسلما نتایج بهتر و قابل اعتماد تری را نشان خواهد داد.

در مطالعه موجود از روش شمارش AgNOR به دلیل عدم وجود امکانات مرفومتریک استفاده شده است که امکان خطا هم وجود دارد، ولی با این همه نتایج به دست آمده نشان می دهد که میانگین تعداد نقاط شمارش شده در صد سلول پوششی مخاط نرمال ۱/۷۸ کارسینوم زگیلی ۲/۱۳ و SCC I ۲/۸۸ که نشان می دهد با افزایش پرولیفراسیون سلولی میانگین نقاط AgNOR هم افزایش می یابد.همچنین متوسط درصد سلول های میانگین نقاطAgNOR هم افزایش می یابد.

همچنین درپرولیفراسیون سلولی، میانگین نقاط AgNOR هم افزایش می یابد ومتوسط درصد سلولهای با ۳ نقطه یا بیشتر AgNOR در مخاط نرمال ۵٪، کارسینوم زگیلی ۲۶٪ و SCC گرید I ۳۷٪ می باشد که نشان می دهد مقدار DNA در سلولهایی که بدخیمی بیشتر دارند بالاتر است.

اختلافات مشاهده شده در این مطالعه بین مخاط نرمال ، کارسینوم زگیلی SCC گرید I با تکنیک AgNORs این روش را روشی قابل اعتماد، ارزان جهت برآورد میزان تکثیر سلولی و روشی مفید در کنار و به موازات روش های روتین بررسی هیستوپاتولوژیک (H&E) و ایمنوهیستوشیمی در تشخیص و افتراق تومورهای خوش خیم و بدخیم و ارزیابی تمایز، عود، رفتار بیولوژیک نئوپلاسم های مختلف به خصوص کارسینوم زگیلی حفره دهان معرفی می کند.

****

References

1- Ever sole LR, Duffy D C, Powell NB, 1995.Clear–cell odontogenic carcinoma – a clinic pathological analysis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121:685-689.

2- Yamamoto H, Inui M, Mori A et al 1998 Clear cell odontogenic carcinoma. Oral Surg Med Oral Pathol 86:86-89.

3- Ackerman LV. Verrucous carcinoma of the oral cavity.Surgery 23:670-678,1984.

4- McDonald JS, Crissman JD, Gluckman JL. Verrucous carcinoma of the oral cavity. Head and Neck Sur Aurg 5: 28, 1982.

5- Prioleau PG, Santa Cruz DJ, Meyer JS, Bauer WC. Verrucous carcinoma. A light and electron microscopic, auto radiographic, and immunofluorescence study. Cancer 45:2849-2857, 1980.

6- Kraus FT, Perez – Mesa C.Verrucous carcinoma. Clinical and pathologic study of 105 cases involving oral cavity, larynx and genitalia. Cancer 19: 26-38,1966.

7- McCoy JM, Waldron CA.Verrucous carcinoma of the oral cavity. A review of forty-nine cases. Oral Surge Oral Med Oral Pathol 52:623-629,1981.

8- Sandstorms B, Mormstad H, Axel T. Oral carcinoma associated with snuff dipping. Some clinical and histological characteristics of 23 tumours in Swedish male. J Oral Pathol 11:245-251, 1982.

9- Batsakis TD, Hybels R, Crissman JD, Rice DH: The pathology of head and

www.SID.ir

Archive of SID

neck tumors. Verrucous Carcinoma, Part 15. Head Neck Surg 5:29-38,1982.
10- Tian Z, Guo W,Zhang WG: The expression of E- Cadherin in oral Cancer with different behavior shanghai kou oiang yi xue 2002; 4:350-2.
11- Poh Cf , Zhang L, Lam WL etal : A high ferquency of allelic loss in oral verrucous lesions may malignant risk. Lab Invest. 2001; 4:629- 34.
12- Wu M, Putti Tc, Bhuiya TA: Comparative Study in the expression of P53,EGFR, TGF- alpha, cyclin D1 in verrucous carcinoma, verrucous hyperplasia squamous cell carcinoma of head and neck region. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002; 4:351-6.
13- Paiva Rl,sant; Ana Filho M, Bohrer pl: AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed smoking and alcohol. Anal Quant cytol Histol 2004; 3:175-80.
14- Schwint AE,savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E. Nuclear organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell Carcinoma of human oral Mucosa 1994; 11:2674-9.
15-Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Nuclear organizer region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral kurtosis, dysphasia and squamous cell carcinoma . J oral pathol Med 1993 feb;22(2): 77- 81.
16- Godlewska-Zoladkowska,olszewska E:Verrucous carcinoma histological and molecular analysis. Otolaryngol Pol. 2003; 6: 793-7.
17- Fliss DM, Noble – Topham SE, Mclachlin M: Laryngeal- verrucous carcinoma: a clinicopatholigic study analysis detection of HPV using Polymerase chain reaction. Laryngoscope. 1994; 2: 146-52.
18- Remmerbach TW, Weidenbach H, Muller C: Diagnostic Value of nuclear Organizer regions (AgNOR s) in biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. An Cell Pathol . 2003; 3: 139-46
19- Coletta RD, Cotrim P,Vargas PA, Viualba H: Basaloid squamous Carcinoma of the oral Cavity :report of 40 cases and study of AgNOR, PCNA, P53 and MMP expression. Oral Surg Oral Med Oral Rediol Endod. 2001; 5:563-9.
20- Epivatianos A . Argyrophilic nuclear organizer region associated proteins in human oral normal mucosa, Verrucous Carcinoma and Squamous cell carcinoma . Ann Dent 1995 summer- fal; 54 (1-2): 25-9.
21- Sethi P,Shah PM. Oral exfoliative cytology of Smokers at discrete clinical stages AgNOR staining 2003; 3: 142-5.

www.SID.ir