Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
دوره ۶۳ ، شماره ۶، صفحات ۵۰۱ تا ۵۰۷ ، (سال ۱۳۸۴)

ارزیابی رنگ‌آمیزی AgNOR در پیشگویی رفتار بالینی مننژیومای سیستم عصبی مرکزی

بیمارستان سینا، ۸۱-۱۳۷۶

دکتر سید علی احمدی (استادیار)، دکتر نسرین صمدی (رزیدنت)
بخش پاتولوژی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: تعداد نقاط AgNOR (Argyrophilic nucleolar organizer regions) با فعالیت رشد سلولی مطابقت دارد.در این مطالعه قابلیت عود و پتانسیل بدخیمی مننژیوما را با شمارش نقاط AgNOR در هسته مقایسه نموده ایم.

مواد و روشها: ابتدا کلیه موارد مننژیوما در بیمارستان سینا طی سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷۶ مورد بررسی قرار گرفته، درجه بندی انها با روش سازمان بهداشت جهانی و محمود مجدداً تعیین شد. سپس ۸۱ نمونه شامل ۱۴ مننژیوم خوشخیم کرانیال اولیه فاقد عود (تا پایان سال ۱۳۸۲)، ۱۴ مننژیوم خوشخیم کرانیال اولیه دارای عود، نمونه عود انها، ۱۴ آتیپیک، ۱۱ بدخیم و ۱۴ اسپاینال انتخاب شدند. در کلیه آنها رنگ‌آمیزی AgNOR انجام شد و میانگین، میانه و انحراف معیار نقاط در آنها تعیین شد.

یافته‌ها: میزان نقاط AgNOR متناسب با گرید افزایش نشان میداد، اختلاف معنی‌داری بین مننژیوم خوشخیم باآتیپیک و بدخیم ($p <$ ۰/۰۰۰۱) و نیز بین مننژیوم خوشخیم کرانیال بدون عود و دارای عود ($p <$ ۰/۰۰۰۱) وجود داشت، اما فرم آتیپیک و بدخیم، کرانیال و اسپاینال و نیز انواع اولیه و عود انها باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. متوسط تعداد AgNOR کمتر از ۲/۳ با اختصاصیت۹۳٪ تومورهای خوشخیم را از انواع اتیپیک و بدخیم جدا می‌نماید. همچنین در ۹۳٪ از تومورهای دارای نمای بافت‌شناسی خوشخیم در صورتی که متوسط نقاط AgNORکمتر از ۱/۸ باشد قابلیت عود ندارند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: باتوجه به نتایج بدست آمده بنظرمیرسد میزان AgNOR با گریدو قابلیت عود تومور ارتباط دارد و ممکن است در پیشگویی رفتار بالینی مننژیوم مفید باشد.

کلمات کلیدی: AgNOR، مننژیوما، مننژیوم خوشخیم کرانیال.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

منتژیوما شایعترین تومور اولیه غیرگلیال دستگاه عصبی مرکزی است (۱). این تومور معمولا خوشخیم بوده و تمایل زیادی به درگیری بافت مغز ندارد و میتواند با برداشت کامل توسط جراحی درمان شود (۲). اما عود آن تحت تاثیر عواملی چون محل تومور، تهاجم عصبی یا عروقی، میزان برداشت تومور توسط عمل جراحی و پتانسیل رشد قرار دارد و میزان ان در بررسی‌های مختلف ۹ الی ۲۲ ٪ بیان شده است (۳). بندرت انها واضحا بدخیم بوده و منجر به متاستاز می‌شوند (٤). ارتباط بین نمای بافت شناسی و رفتار بالینی منتژیوما بدرستی مشخص نمیباشد چرا که مواردی از منتژیوما با نمای بافت شناسی کاملا خوشخیم میتوانند پس از برداشت کامل توسط جراحی عود نمایند. ارزیابی اندکسهای رشد میتواند به بافت شناسی معمول در پیشگویی عود و تعیین سرنوشت بیمار کمک نماید. در سال ۱۹۹۷ مواردی از منتژیوما تحت عنوان منتژیومهای خوشخیم دارای رشد سریع شناسایی شدند که از نظر بافت شناسی از انواع خوشخیم غیر راجعه غیر قابل شناسایی هستند (۵). ولی اندکسهای پرولیفراتیو بالاتری دارند که با متدهای مختلف ارزیابی کینتیک سلولی شامل تعیین میزان DNA با استفاده ازفلوسیتومتری، اندکس نشاندارشدن با(PCNA (proliferating cell nuclear antigen، BudR (5-bromodexyuridine)، Ki-67 و (organizer region AgNOR (silver staining nucleolar بررسی شده است (٤،٦،٧). بر اساس این مطالعات همچنین ممکن است بتوانیم نیاز به درمانهای کمکی از جمله رادیوتراپی با استفاده از این اندکسها تعیین نماییم (٦).

Nucleolar organizer region (NOR) سگمانهایی از کروموزومها بوده، که محتوی ژنهای کد کننده ریبوزومی می‌باشد و بر روی بازوی کوتاه کروموزومهای ۱۳،۱٤،۱۵،۲۱ و۲۲ متمرکز هستند.

همراه آنها گروهی از پروتئینهای اسیدی غیر هیستونی که تمایل به باند شدن به نقره دارند نیز در این محل قرار دارند. میزان این پروتئینها در نمونه‌های سیتوهیستولوژیک از اوائل فاز G_1 افزایش یافته و در پایان فاز S به حد ماکزیمم میرسد. بنابراین تعداد و سایز AgNOR در هسته بر طبق سرعت تقسیم سلولی (doubling time) و مدت زمان سیکل سلول متغیر است (۸،۹).

اهداف این مطالعه شامل: ۱- ارزیابی ارتباط بین گرید منتژیوما و شمارش نقاط AgNOR بخصوص در جدا کردن انواع خوشخیم و بدخیم از یکدیگر۲- بررسی ارزش AgNOR در تعیین قابلیت عود تومور ۳- مقایسه پتانسیل رشد منتژیومهای داخل جمجمه و نخاع می‌باشد.

مواد وروش‌ها

این مطالعه از نوع تحلیلی مقطعی(cross sectional) و گذشته‌نگر می‌باشد. ابتدا کلیه موارد منتژیوم سیستم عصبی مرکزی که در طی سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷٦ در بیمارستان سینا تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، شامل۲۳۸ نمونه بررسی قرار گرفت و با سیستم طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۰ (۱۱،۱۰،٤) گرید آنها مشخص شد. در ضمن همانژیوپریسیتومای منتژ از گروه بیماران کنار گذاشته شد.در مورد هر بیمار اطلاعات بالینی از جمله سن، جنس، محل درگیری، وسعت برداشت توسط جراحی و تاریخچه عود تا پایان سال ۱۳۸۲ با استفاده از پرونده بستری استخراج گردید. بیماران دارای اطلاعات ناکافی یا شک به کامل بودن برداشت جراحی از مطالعه حذف گردیدند. سپس از بین ۲۳۸ نمونه ارزیابی شده، تعداد۸۱ بیمار انتخاب شد که شامل : (از این به بعد تحت عنوان گروه ۱ الی ٦ نامیده خواهند شد.)

گروه ۱ - بیماران دارای منتژیوم خوش خیم اولیه داخل مغزی که در مدت فوق عود نداشتند(شامل ١٤ نمونه که به صورت تصادفی از بین موارد موجود انتخاب شد).

گروه ۲- موارد منتژیوم‌های خوش خیم اولیه داخل مغزی که در این مدت عود کرده بودند (شامل ١٤ نمونه).

گروه ۳- موارد عود گروه قبلی.

گروه ٤- منتژیوم آتیپیک داخل مغزی (شامل ١٤ بیمار).

گروه ۵- منتژیوم بدخیم داخل مغزی (شامل ۱۱ نمونه).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱ -میانگین سنی و جنسی گروههای مورد مطالعه

سن وجنس / شماره گروه	گروه	میانگین سن	دامنه سن	تعداد مرد	تعداد زن	تعداد کل
گروه ۱	اولیه فاقد عود	۵۲	۶۸-۲۹	٤	۱۰	۱٤
گروه ۲	اولیه دارای عود	٤۱/۱٤	۵٦-۱٦	٦	۸	۱٤
گروه ۳	راجعه	٤۷/۹۳	۵۵-۲۲	٦	۸	۱٤
گروه ٤	آتیپیک	٤۱/٤۳	۷۲-۱۳	۱۰	٤	۱٤
گروه ۵	بدخیم	۵۱/۲۷	٦۵-۷٦	۹	۲	۱۱
گروه ٦	اسپاینال	٤۹/۰۷	۷٦-۱۳	۷	۷	۱٤

گروه ٦- مننژیوم نخاعی خوش خیم (شامل ۱٤ مورد).

سپس بلوک مناسب از هر کدام انتخاب گردید و با متد Ploton (۱۹۸٦) (۱۲) رنگ‌آمیزی شد. بررسی میکروسکوپی بدون اطلاع از نوع مننژیوم , در فیلدهای متعدد در هر لام با بزرگنمایی ۱۰۰۰ × با روغن ایمرسیون بعمل آمد. تعداد نقاط رنگ‌آمیزی شده در هسته حد اقل ۲۰۰ سلول مننگوتلیال شمرده شد و هسته‌های فاقد نقاط AgNOR در محاسبه منظور نشدند (زیرا این نقاط در سلولهای در حال مرگ محو می‌شوند). در تومورهای غیریکنواخت مانند بعضی از انواع مننژیوم اتیپیکال شمارش در مناطق دارای بیشترین درجه اتیپی سلولی انجام شد هرنمونه بصورت مستقل توسط دو نویسنده مقاله ارزیابی شده ومیزان اختلاف بین این ۲ شمارش کمتر از ۵٪ بود.سپس میانگین، حداقل و حداکثر نقاط AgNOR در هر نمونه و همچنین میانگین , میانه و انحراف معیار تعداد نقاط را در هر گروه محاسبه و ثبت گردید.

در بررسی آماری با استفاده ازروشهای آنالیز آماری غیر پارامتریک Kruskal –Wallis test و Mann-Whitney test توزیع نقاط در گروه‌های مختلف با هم مقایسه شده و P value کمتر از ۰/۰۵ ارزشمند تلقی شد.

جدول شماره ۲ – مقایسه ارتباطات دو به دو گروههای مورد مطالعه، میزان U Mann-Whitney و P valueدر موارد وجود رابطه

مقایسه دو به دو بین گروهها		کرانیال					اسپاینال
		گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه٤	گروه ۵	(گروه ٦)
کرانیال	گروه ۱	---	U=۲۳ p<۰/۰۰۰۱	---	U=۱۹/۵ p<۰/۰۰۰۱	U=۹ p<۰/۰۰۰۱	NS
	گروه ۲	U=۲۳ p<۰/۰۰۰۱	---	NS	NS	U=٤۰ p<۰/۰۰۰۱	---
	گروه ۳	---	NS	---	---	---	---
	گروه ٤	U=۱۹/۵ p<۰/۰۰۰۱	NS	---	---	NS	---
	گروه ۵	U=۹ p<۰/۰۰۰۱	U=٤۰ p<۰/۰۰۰۱	---	NS	---	---
	اسپاینال(گروه ٦)	NS	---	---	---	---	---

شماره‌های ۱-٦ دلالت بر گروه مورد بررسی دارد

NS = عدم رابطه معنی دار Mann-Whitney test=U بین گروهها

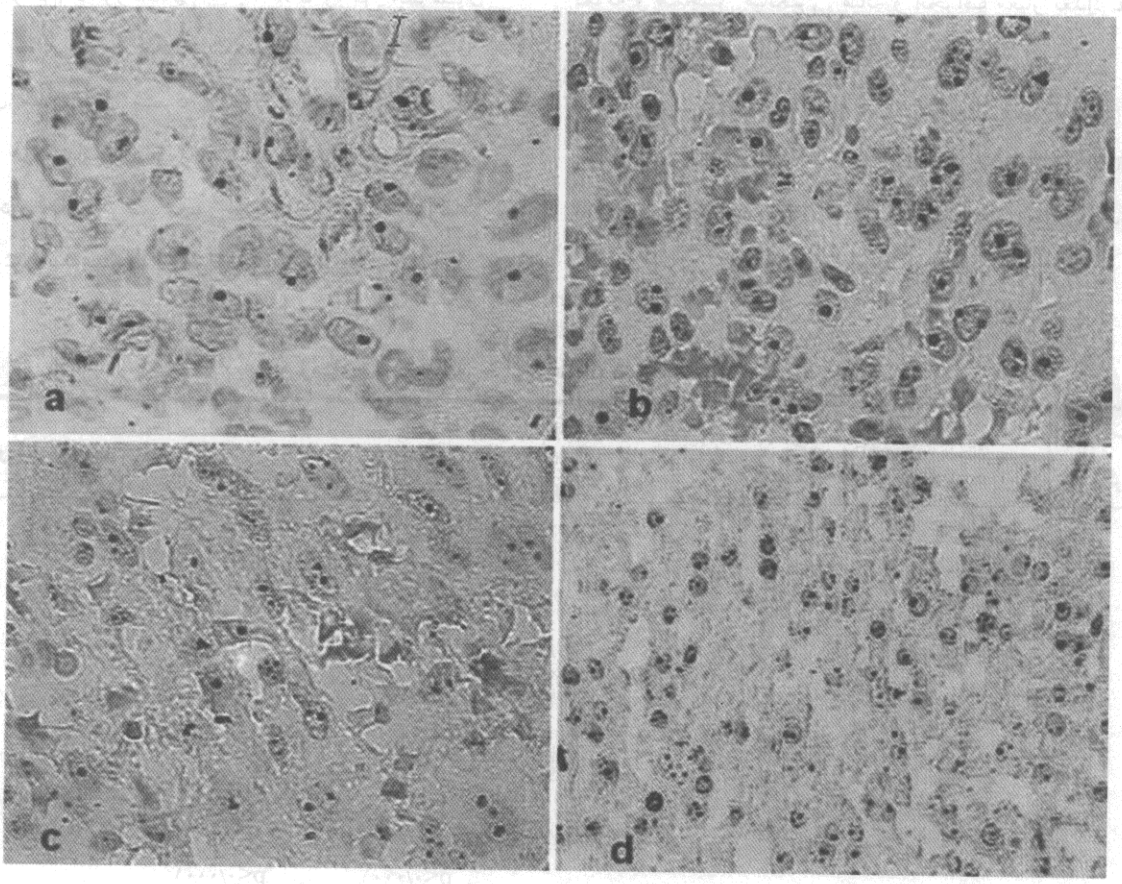
www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

میانگین سنی گروه مورد مطالعه ۴۶/۹۹ (۱۳ تا ۷۶ سال) میباشد و از نظر جنسی ۴۲ نمونه متعلق به جنس مذکر و ۳۹ نمونه متعلق به جنس مونث میباشد.در ضمن در موارد آتیپیک و بدخیم فراوانی در جنس مذکر بیشتر است پراکندگی سنی و جنسی هر کدام از گروههای مورد مطالعه بر طبق جدول شماره ۱ می‌باشد. در همه نمونه‌ها نقاط واضح رنگ شده توسط نقره در هسته ۲۰۰ سلول شمرده شد. در انواع خوشخیم غیر راجعه بیشتر هسته‌ها فقط یک نقطه AgNOR بزرگ داشتند ولی در سایر گروهها با افزایش گرید تومور افزایشی در تعداد نقاط در هسته همراه کاهش پیشرونده سایز انها مشهود بود. میانگین و انحراف معیار انواع خوشخیم غیر راجعه ۱/۳۷ (۰/۳۸)، انواع راجعه ۱/۸۷ (۰/۳۸)، اتیپیک ۲/۰۱(۰/۳۶)، بدخیم ۲/۳۹ (۰/۷۴) و نمونه‌های داخل نخاعی ۱/۲۴ (۰/۱۴)بودند (شکل ۱).

افزایش تعداد نقاط AgNOR از خوشخیم به اتیپیک و بدخیم مشاهده می‌شود. اگرچه اختلاف بین انواع خوشخیم با اتیپیک و بدخیم معنی داربود (P در هر دو کمتر از ۰/۰۰۰۱) اما تفاوت معنی‌داری بین انواع بدخیم و اتیپیک وجود نداشت. به مقایسه اختلاف تعداد نقاط AgNOR در هر یک از گروههای مورد مطالعه با استفاده از Mann-Whitney test در جدول شماره ۲ دقت نمایید.



شکل شماره ۱- نمای رنگ‌آمیزی *AgNOR* با درشت نما یی ×۱۰۰۰. **a**: منتژیوم خوشخیم کرانیال اولیه فاقد عود **b**: منتژیوم خوشخیم کرانیال راجعه (در تعداد زیادی از سلولها ۲ یا بیشتر نقطه AgNOR وجود دارد).**c**: منتژیوم آتیپیک (از نوع*chordoid*) **d**: منتژیوم بدخیم (از نوع سلول کوچک) در تعداد زیادی از سلولها ۲ یا بیشتر نقطه AgNOR وجود دارد

www.SID.ir

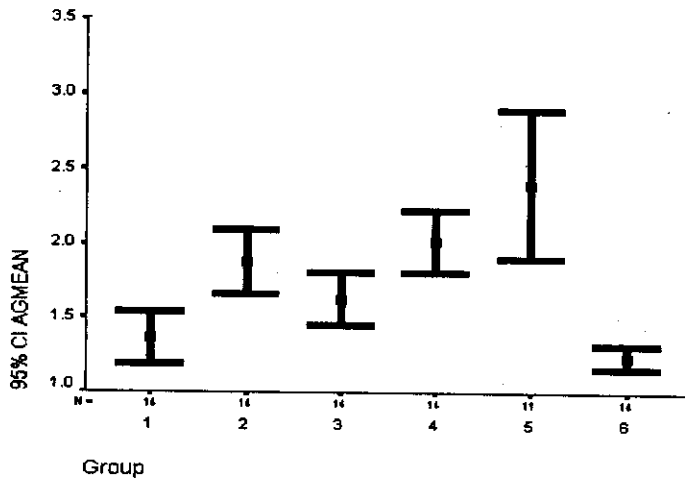
Archive of SID

بحث

اگر چه شمارش نقاط AgNOR از اولین متدهای مورد استفاده در بررسی رشد سلولی است و تحت اثر تفاوتهای تکنیکی قرار میگیرد اما هنوز هم با ارزش است. PCNA، BudRو Ki-67 درصد سلول‌های در حال رشد را نشان می‌دهند ولی سرعت رشد واقعی نه فقط وابسته به درصد سلولهای در حال رشد است بلکه مدت زمان سیکل سلولی که توسط AgNOR میتواند تعیین شود نیز از عوامل مهم می‌باشد (۱۳،۱٤). علاوه بر این بعنوان یک روش کمکی در بررسی با روشهای بافت شناسی معمول AgNOR هنوز هم ساده ترین و ارزانترین متد قابل انجام بر روی برشهای پارافینه بوده قابل انجام در هر ازمایشگاهی میباشد.همانطور که قبلا توسط Maier (۱) و Capelle (۱۵) بیان شده بود در این مطالعه نیز شمارش AgNOR با گرید تومور ارتباط داشت. اگر چه بین مقادیر بدست امده برای گروههای مختلف بخصوص انواع اتیپیک و بدخیم تا حدی همپوشانی وجود داشت (نمودار ۱) که می‌تواند بعلت اندکسهای بالای رشد هر دو تومور باشد. با استفاده از منحنیROC ( ) receiver operating characteristics و بدست اوردن نقطه cut off معادل ۲/۳ برای شمارش AgNOR بین گروههای خوشخیم با بدخیم و اتیپیک میتوانیم این گروه‌ها را با حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب ۳۲٪، ۹۳٪، ٦۷٪ از هم جدا نماییم.همچنین مشخص شد که وجود هسته هایی با تعداد نقاطAgNOR بیش از ٦ میتواند منتژیوم خوشخیم را از بدخیم و اتیپیک با حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب ٤۵٪ ،۹۹٪ و ۹۲٪ جدا نماید.

در مطالعه اخیر همانند بررسیCapelle[۱۵] وScarpelli[۱٦] رابطه مثبت قوی بین شمارش میزان AgNOR و پتانسیل عود وجود دارد. در حالیکه Orita [٦] نتوانست چنین رابطه ای را نشان دهد که شاید بعلت تفاوت بارز حجم نمونه‌های دو گروه مورد مطالعه باشد .

بعنوان معیاری برای تخمین پتانسیل عود در منتژیومها با استفاده از منحنی ROC(receiver operating characteristics) میانگین ۱/۸ را بعنوان cut off برای افتراق انواع دارای پتانسیل عود بالاتر و انواع فاقد عود در مدت مطالعه تعیین نمودیم. که حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت این تست به ترتیب مساوی ٦۰٪، ۹۳٪ و ۸۲٪ میباشد.در ضمن منتژیوم‌های غیرراجعه بندرت دارای هسته هایی با تعداد AgNOR مساوی یا بیشتر از ٤ می‌باشند (حساسیت ،اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب مساوی ۸۰٪، ۸۸٪ و ۹۲٪ می‌باشد.)



نمودار شماره ۱- مقایسه میزان AgNOR بین گروههای مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه مشابه بررسی De Stefano (۱۷) و Maier (۱) فاوتی بین تومورهای اولیه و عود آنها وجود نداشت که نشان می‌دهد که از ابتدا پتانسیل عود در این گروه وجود داشته است. میزانAgNOR منتژیوم‌های خوشخیم راجعه با انواع بدخیم تفاوت معنی‌داری داشت اما با منتژیوم اتیپیک نداشت که مشابه مطالعه Kudoh (۵) با سایر اندکسهای رشد میباشد. این امر احتمالا نشانه ارتباط نزدیک اندکسهای پرولیفراتیو و رفتار بالینی تومور می باشد که الزاما با نمای بافت شناسی مطابقت ندارد..

در این مطالعه برخلاف بررسی Arumi (۱۸) تفاوتی بین منتژیومهای خوشخیم داخل جمجمه و داخل نخاعی وجود نداشت. ولی مطالعات دقیق‌تر با حجم جمعیت بیشتر برای تایید این مسئله لازم است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه پیشنهاد مینماید که ارزیابی مارکرهای رشد سلولی از جمله AgNORهمراه روشهای مرسوم بافت شناسی میتواند به ارزیابی بهتر بافت‌شناسی و پیشگویی رفتار بالینی تومورها حتی اگر ظاهر بافت شناسی انها خوشخیم باشد کمک نماید.

منابع

1. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance, J. Neurosurg, 1992,77:616-623.

2. Rosenblum M K, Bilbao JM, Ang LC. Neuromuscular System: Meningiomas In Rosai & Ackerman's surgical pathology. Volume1. 9th edition. Edited by Rosai J. Philadelphia: Mosby; 2004: 2564-2572.

3. Akeyson EW, Mccutcheon IE. management of benign and aggressive intracranial meningiomas .Oncol 1996 May; 10(5):747-759.

4- Burger P, Scheihauer BW, Vogel FC. Intracranial meninges, In: Surgical pathology of nervous system and its coverings.4th ed. Philadelphia, Churchill Livingston; 2002.p: 49-71.

5. Kudoh CH, Detta A, Yeh J, Jackowski A, Hitchock ER, Yoshimizu N et al. Rapidly growing benign meningiomas; correlation with clinical features and histological diagnosis. Clinic neurol and neurosurg 1997 July; 99, suppl 1:s239.

6. Orita T., Kajiwara K, Nishizaki T, Ikeda N, Kamiryo T, Aoki H. Nucleolar organizer region in meningioma, Neurosurg.1990,21(1) ,43-45.

7. Ferraraccio F, Accardo M, Giangaspero F, Cuccurullo L. Recurent and atypical meningiomas – a multiparametric study using Ki-67 labelling index , AgNOR and DNA

www.SID.ir

Archive of SID

Feulgen staining: Clin Neuropathol 2003; 22 (4): 187-192.

8. Derenzini M. The AgNORs. Micron 2000; 31: 117-120.

9. Derenzini M, Trere D, Chieco P, Melchiorri C. Interphase AgNOR is not related to DNA content in 11 established human cancer line. Exp Cell Res 1994; 211: 282-285.

10. Perry A, Scheithauer B, Stafford S, Lohse CM, Wollan PC. Malignancy in meningiomas a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications, Cancer 1999; 85:2046-2056.

11. Perry A, Stafford S, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse C. Meningioma grading: an analysis of histopathologic parameters. Am J Surg Pathol ; 1997 ,21 (12) :1445-1465.

12. Ellis I. Assessment of prognosis in practice .In: Bancroft J, Gamble M (editors) theory and practice of histopathological techniques ,5th ed,UK:Churchill livingstone ,2002 .p:506.

13. Brugal G. Interpretation of Ki-67 / AgNOR proliferation markers, Anal Cell Pathol 1996; 10: 212 (abs).

14. Nakabayashi H, Sunada I, Hakuba A. Evaluation of proliferative activity of benign brain tumors using AgNOR X Ki-67, Clin Neurol Neurosurg 1997, supp 1, s228.

15. Capelle L, Kujas M, Sichez JP, Van Effenterre R, Faillo T, Arthuis F et al. Prognostic value of NORs counting method applied to meningiomas: correlation with radio-clinical data and follow up, anal Cell pathol 1996,10(2):224.

16. Scarpelli M, Montroni R, Sisti s, Maruzzi GM, Brancorsini D, Brancorsini D et al. quantitative evaluation of recurrent meningioma, Pathol Res pract 1989,185(5): 746-751.

17. De Stefano V, Salvatore G, Monticelli A, Riccio P, Cappabianca P, Bucciero A. Prognostic significance of Nucleolar organizer regions in meningiomas. , J Neurologic Sci .1996, 40(2), 89-92.

18. Arumi M, Aameda F, Galite E. Serrano S. Value of AgNORs in predicting behavior of meningioma. E J Pathol [serial on the Internet]. 1996 Dec, [cited 2002 Oct 19]; 2(4): 964-05 .Available from: URL: http://ejpath.amu.edu.pl/EJP

www.SID.ir