Archive of SID

ارزیابی کمی و کیفی رنگ‌آمیزی Ag NOR در افتراق ضایعات خوشخیم و بدخیم ملانوسیتیک پوست

*دکتر تقی غیاثی مقدم، دکتر میترا فتحی، دکتر علیرضا قنادان

*بخش آسیب‌شناسی، بیمارستان قائم (عج)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

نقاط سازمان دهنده هستکی (NORs) حلقه‌هایی از DNA ریبوزومال در هستك هستند که با پروتئینهای اسیدی همراهند. این نقاط در برشهای پارافینی که به طور معمول تهیه می‌شوند با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره به صورت نقاط سیاهرنگ که AgNORs نامیده می‌شوند، قابل مشاهده هستند. پیشنهاد شده است که تعداد AgNOR در هر سلول می‌تواند ضایعات خوشخیم و بدخیم ملانوستیك پوست را از هم افتراق دهد. در مطالعه ما، روش رنگ‌آمیزی NOR با نیترات نقره بر روی برشهای پارافینی یك نووس جانکشنال، ۱۴ نووس کامپاند ، ۱۵ نووس اینترادرمال، ۳ نووس اسپیتز ، ۳ ملانوم بدخیم لنتیگو، ۱۳ ملانوم بدخیم و ۳ ملانوم ثانویه انجام شد. تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین تعداد AgNOR در ۳۳ ضایعه خوشخیم (متوسط۱/۷۳۳ با انحراف استاندارد ۱/۵۶۷) و۱۹ ملانوم (متوسط ۸/۰۲۷ با انحراف استاندارد ۱/۶۵۸) توسط آنالیز تست t ($P < ۰/۰۰۱$) وجود داشت. از آنجایی که در بررسی میکروسکوپی به قدر کافی تفاوت وجود داشت، پیشنهاد می‌شود که از تکنیك معمولی رنگ‌آمیزی AgNOR به عنوان کمك تشخیصی در افتراق خالهای ملانوسیتی از ملانومهای بدخیم استفاده شود.

کلمات کلیدی: ضایعات ملانوسیتی، ملانوم، AgNOR.

مقدمه

عدم هماهنگی در تشخیصهای هیستوپاتولوژیك ملانوم و خالهای ملانوسیتیك میان پاتولوژیستهای با تجربه منجر به عدم تصمیم‌گیری قاطع در رابطه با تمایز ملانوم از خالهای ملانوسیتیك شده است. نتایج یك تحقیق (۹) نشان داده است که کرایتریای لازم برای تشخیص ملانوم و خالهای ملانوسیتیك نیاز به تصحیح و استحکام بیشتری دارد. گرچه در بسیاری ازموارد تمایز خالهای ملانوسیتیك از ملانوم آسان است، اما مواردی وجود دارد که افتراق آنها به‌آسانی و با اطمینان مقدور نمی‌باشد. شمارش نقاطAgNOR در ملانومهای بدخیم به طور مشخصی بیشتر از هر ضایعه ملانوستیك خوشخیم است. بنابراین یك تست تشخیصی مفید از لحاظ عملی می‌باشد (۳۰). مناطق سازمان دهنده هستکی (NORs) حلقه‌هایی از DNA ریبوزومال در هستك هستندکه با پروتئینهای اسیدی همراهند و در مرحله اینترفاز ظاهر می‌شوند (۲۹،۲،۱). آنها شامل‌نوکلئوپروتئینهای غیرهیستونی هستند و به علت داشتن مقدار زیادی گروههای سولفیدریل وکربوکسی به وسیله یك تکنیك آرژیروفیل (AgNORs) نشان داده می‌شوند. چون مولکولهایDNA ریبوزومال مکان اصلی سنتز پروتئین هستند، بنابراین به نظر می‌رسد که مقدار NORs نشان دهنده فعالیت سلولی و هسته‌ای باشد و به همین دلیل توانایی نشان دادن پرولیفراسیونها،ترانسفورماسیونها و بدخیمی‌ها را دارد (۷).

تعداد و اندازه نقاط AgNORs در ارتباط با فعالیت سلولی است و نشان دهنده درجه بدخیمی‌می‌باشد. بنابراین شمارش AgNORs ممکن است با فعالیت پرولیفراتیو تومورها در ارتباط باشد (۱۵،۱۳،۲).

این نقاط در برشهای پارافینی که به طور معمول تهیه می‌شوند با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره به صورت نقاط سیاهرنگ قابل مشاهده هستند (۲۹). توجه به این موضوع و

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات فراوانی که تاکنون در افتراق ضایعات ملانوستیك خوشخیم از بدخیم با استفاده از این نوع رنگ‌آمیزی صورت گرفته است انگیزه‌ای برای‌انجام این تحقیق و مقایسه نتایج آن با مطالعات قبلی شد (۵،۱۰،۱۲،۱۴،۱۶،۱۹،۲۱،۲۵،۲۶،۲۷).

مواد و روش کار

نمونه‌ها: بلوکهای پارافینی پنجاه و دو مورد که شامل پانزده مورد نووس درمال، چهارده مورد نووس کامپاند ، یك مورد نووس جانکشنال، سه مورد نووس اسپیتز (Spitz)، نوزده مورد ملانوم بدخیم(سه مورد ملانوم لنتیگومالیگنا، سیزده مورد ملانوم توموریژنیك و سه مورد ملانوم متاستاتیك) بود، انتخاب شده و پس از بازبینی از هر بلوك دو برش به ضخامت سه میکرون تهیه و به روش H&E و AgNOR رنگ‌آمیزی شدند.

روش رنگ‌آمیزی: پس از اینکه برشهای سه میکرونی از بلوکهای پارافینی تهیه شدند به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۱۰۰٪ فیکس نموده و سپس به مدت ۶۰ - ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق در داخل محلول نیترات نقره تازه قرار دادیم. سپس در سریهای الکل دهیدارته کرده لامل چسبانده و مورد بررسی‌میکروسکوپی قرار گرفتند.

روش ارزیابی: در رنگ آمیزی AgNOR نقاط سیاهرنگ به صورت مجزا و یا به صورت تجمعاتی مشاهده شد. در شمارش AgNOR تجمعاتی از نقاط که به صورت جداگانه قابل شمارش نیستند، به عنوان نقطه واحدی در نظر گرفته شد. با شمارش یکصد هسته به صورت تصادفی، متوسط نقاطAgNOR برای هر نمونه منظور شد. ملانین سیتوپلاسمیك نیز در رنگ‌آمیزی نقره کلوئیدی رنگ می‌گیرد در مواردی به خصوص در خالهای ملانوسیتیك پیگمانته و ملانوم پاژتوئید ممکن است نقاط AgNOR را بپوشاند. گرچه در تمام موارد می‌توان مقدار لازم برای شمارش را در بین سلولها یافت.

نتایج

تعداد AgNOR در یکصد سلول شمارش شده، در ضایعات ملانوم بدخیم، در مقایسه با انواع خالهای خوشخیم به طور قابل توجهی بیشتر بود. با افزایش تعداد نقاط اندازه آنها نیز کوچکتر ونامنظم‌تر می‌شد. شمارش متوسط NORs و مقایسه آنها در گروههای مورد مطالعه در جدول۱ آمده است. براساس جدول ۱ و آزمون t-student از نظر آماری بین میانگین شمارش AgNOR در دوگروه مورد مطالعه اختلاف معنی داری وجود دارد (t = -۱۳/۶۶ و P <۰/۰۰۱). مقایسه تعداد، میانگین و انحراف معیار شمارش AgNOR در دو گروه فوق به تفکیك درجداول ۲ و۳ آمده است. براساس جدول ۲ و آزمون t-studnt بین میانگین شمارش AgNOR در نووس کامپاند(گروه ۱) و نووس اینترادرمال (گروه ۲) با نووس اسپیتز (Spitz)، (گروه ۴) اختلاف معنی داری از نظرآماری وجود دارد. در این آزمون گروه ۳ مورد آزمون قرار نگرفت. برای اطمینان بیشتر به نتایج از آزمون کروسکال - والیس (Kruskal - Wallis) استفاده شد که باز هم از نظرآماری اختلاف بین توزیع داده‌ها معنی دار بود (P<۰/۰۴ و Chi - Square = ۸/۳). براساس آزمون کروسکال - والیس، توزیع داده‌ها در سه گروه فوق یکسان نیست و از نظرآماری اختلاف معنی داری بین آنها وجود دارد (P <۰/۰۳ و Chi - Square =۷/۷۲) و با استفاده از آنالیز واریانس مشخص شد که گروه ۵ و ۶ با گروه ۷ اختلاف معنی دار دارند، ولی گروه ۵ باگروه ۶ اختلاف معنی داری ندارد. در این بررسی تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شمارش AgNOR در ضایعات خوشخیم و بدخیم‌ملانوسیتیك مشاهده شد. در شمارش AgNOR در دو گروه نووس اینترادرمال و کامپاند تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد (شکل ۱و۲) اما هر دو گروه تفاوت معنی داری با نووس اسپیتز (Spitz)، نشان دادند (شکل ۳). در این بررسی از مجموع ۳۷ مورد خال خوشخیم به جز یك مورد متوسط شمارش AgNOR کمتر از ۲ را در شمارش ۱۰۰ هسته نشان دادند. مورد استثناء واریانسی از نووس اینترادرمال به نام نووس نوروئید بود که شمارش متوسط AgNOR آن ۳/۲ بود که در همپوشانی با ضایعات بدخیم قرار نداشت. در گروه نووس اسپیتز (Spitz) از ۳ مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شده یك مورد با شمارش ۱/۴۶AgNOR، یك مورد با شمارش ۴/۴ و مورد سوم ۹/۷ مشاهده شد که مورد سوم در تداخل با گروه بدخیم می‌باشد. در گروه ضایعات بدخیم ملانوسیتیك، لنتیگومالیگنا ملانوما و ملانوم بدخیم ندولرتفاوت‌معنی داری درشمارش متوسط AgNORs با هم نشان ندادند ولی هر دو گروه تفاوت معنی‌داری را با گروه سوم یعنی متاستاز ملانوم نشان دادند. چنانکه شمارش متوسط AgNORs درمتاستاز ملانوم بالاتر از دو گروه بدخیم دیگر بود (شکل ۴ و ۵).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار نقاط AgNORدر ضایعات خوشخیم و بدخیم ملانوسیتیک پوست

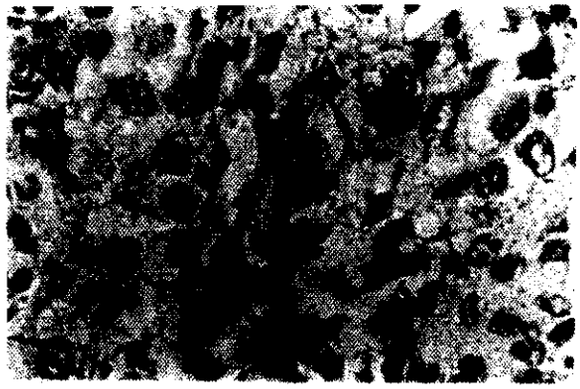
نوع ضایعه	تعداد	میانگین	انحراف معیار
خوشخیم	۳۳	۱/۷۳۳	۱/۵۶۷
بدخیم	۱۹	۸/۰۲۷	۱/۶۵۸
کل	۵۲	۴/۰۳۳	۳/۴۴۵

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار نقاط AgNORدر ضایعات خوشخیم ملانوسیتیک پوست

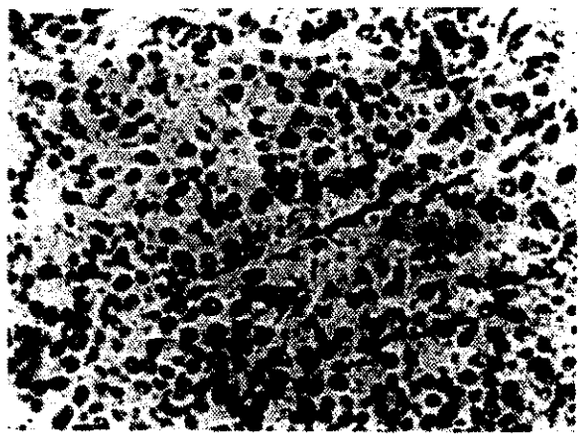
گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار
نووس کامپاند	۱۴	۱/۳۰۷	۰/۲۰۰
نووس اینتردرمال	۱۵	۱/۴۷۷	۰/۵۰۶
نووس جانگشنال	۱	۱/۲۰۰	-
نووس اسپیتز		۵/۱۸۷	۴/۱۷۶
کل	۳۳	۱/۷۳۳	۱/۵۶۷

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار نقاط AgNOR در ضایعات بدخیم ملانوسیتیک پوست

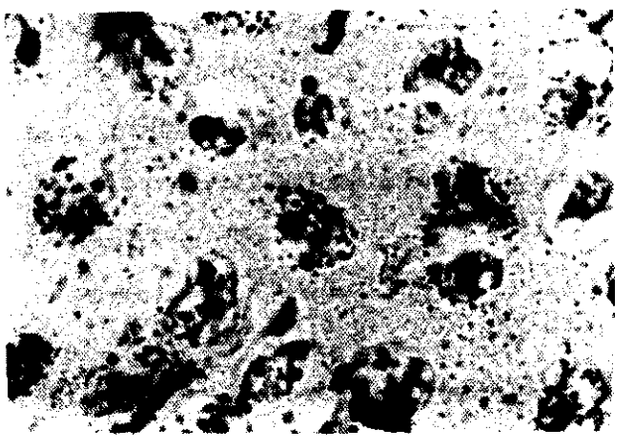
گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار
ملانوم لنتیگومالیگنا	۳	۶/۲۶۶	۰/۶۴۲
متاستاز ملانوم	۱۳	۷/۹۴۷	۱/۲۴۹
ملانوم بدخیم ندولر	۳	۱۰/۱۳۳	۱/۹۰۱
کل	۱۹	۸/۰۲۷	۱/۶۵۸



شکل ۱: نووس اینترادرمال (AgNOR به صورت نقاط سیاهرنگ منظم و اندک)



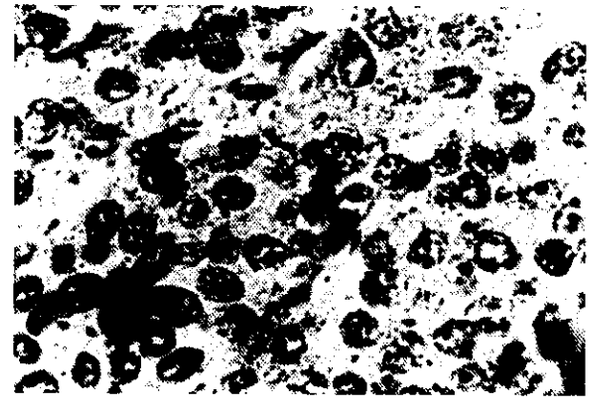
شکل ۲: نووس کامپاند (AgNOR به صورت نقاط سیاهرنگ منظم و اندک)



شکل ۳: نووس اسپیتز (Spitz) (تعداد نقاط AgNOR بیشتر و حدود آنها نیز نامنظم می باشد).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤: ملانوم لنتیگو مالیگنا (افزایش تعداد نقاط AgNOR با حدود نامنظم).

شکل ٥: متاستاز ملانوم (به کاهش اندازه نقاط AgNOR و حدود نامنظم آنها توجه کنید).

بحث

با توجه به اینکه گاهی موارد پاتولوژیستها در افتراق بین ضایعات ملانوسیتیك خوشخیم از بدخیم پوست با مشکل مواجه می‌شوند برای کمك به تشخیص از فاکتورهای پرولیفراتیو مانند Ki – 67 ، PCNA و AgNOR استفاده شده است.

نواحی سازماندهنده هستکی (NORs) حلقه‌های کروموزمی DNA و پروتئینهایی هستند که در سنتز RNA ریبوزومال شرکت می‌کنند. با رنگ‌آمیزی نقره آنها به صورت نقاط سیاهرنگی ظاهر می‌شوند. اندازه و تعداد آنها بیانگر فعالیت هسته‌ای و سلولی است بنابراین شمارش AgNOR می‌تواند در ارتباط با فعالیت پرولیفراتیو تومورها باشد (۲۹،۲۷،۲۵،۱۶،۱۵،۱۳،۲،۱). گرچه این تکنیك پروتئینهای موجود در NORs را مشخص می‌کند تا خود NORs اما توسط الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید اختصاصی بودن آن نشان داده شده است. نواحی مشاهده شده قابل انطباق با مطالعات هیبریدیزاسیون RNA هستند. شمارش AgNOR در برشهای بافتی نسبی بوده و قطعی نیستند. در چندین مطالعه، شمارش ۳۰ سلول به جای ۱۰۰ سلول به عنوان نماینده تمام ضایعه در نظر گرفته شده است (۲۹،۲۶). در یك مطالعه، امتیاز بندی با SAPA (Subjective Agnor Pattern Assessment) اعتبار بیشتری از شمارش نقاط AgNOR داشته است (۲۰).

شمارش AgNOR هستکی در تمایز، عود و پیش آگهی نئوپلاسمهای ارگانهای مختلف از جمله کارسینومهای کلیه، مثانه ، حلق ، میلوم متعدد و ضایعات ملانوسیتیك پوست به کار رفته است (۲۸). مطالعه سرطان پستان نشان داده است که AgNOR نه تنها در تشخیص سرطان‌کمك کننده است بلکه می‌تواند یك ابزار مفید برای تعیین پیش آگهی بیماری نیز باشد (۲۳،۶). این روش همچنین برای تمایز نئوپلاسم های تیروئید (۶) ، SCC سینوس ماگزیلر و دهان (۲۴،۴) ، کبد (۱۸) ، کولون و رکتوم (۴) ، ریه (۲۳) و پروستات (۳) به کار رفته است. براساس این پژوهش تعداد نقاط AgNOR در ضایعات ملانوم بدخیم بیش از ۴/۵ برابرتعداد نقاط در ضایعات خوشخیم ملانوسیتیك است.

بنابراین ، این دو ضایعه با شمارش ساده نقاط AgNOR از همدیگر افتراق داده می‌شوند که این مطلب توسط دیگران تائید شده است. (۲۹،۲۶،۲۱،۱۶،۱۳،۱۲،۱۰) شمارش AgNOR در نووس ملانوسیتیك خوشخیم (نووس جانکشنال، کامپاند و اینترادرمال) در یك‌حد بوده و در مورد نووس Spitz حدود ۳/۵ برابر بیشتر از تمام آنهاست که اختلاف معنی داراست، اما در تداخل با گروه ضایعات ملانوسیتیك بدخیم قراردارد. این نتیجه در مطالعات دیگران نیز بیان شده است (۲۶،۱۹،۱۶،۱۴،۱۰). گزارش شده است که شمارش ساده AgNOR به نظر می‌رسد که روش مفیدی برای افتراق نووس Spitz و دیسپلاستیك از ملانوم بدخیم نمی‌باشد (۷). در هر حال نظری دیگر بر این است که این روش در مواردی که

www.SID.ir

Archive of SID

مشکل تشخیصی مانند ضایعات ملانوسیتیك حد واسط وجود دارد می‌تواند کمك کننده باشد (۲۶).

در مورد ملانوم بدخیم تفاوت معنی داری بین ملانوم بدخیم لنتیگو و ملانوم ندولر وجود ندارد اما با متاستاز ملانوم اختلاف معنی داری وجود دارد. این موضوع نیز تایید شده است (۱۹). عقیده بر این است در صورتی که شمارش AgNOR در ملانوم بدخیم بیشتر از ۳/۶۲ باشد، ۸۲٪ احتمال متاستاز وجود خواهد داشت (۱۳) اما اکثراً معتقدند که شمارش AgNOR ارزش پروگنوستیك ندارد (۲۹،۱۷). براساس بعضی گزارشات ارزش پروگنوستیك آن از ضخامت Breslow و سطح Clark بیشتر است (۱۳).

نتیجه‌گیری

یك نتیجه کلی از شمارش AgNOR این است که شمارش کمتر از ۲ به نفع ضایعات خوشخیم ملانوسیتیك و شمارش بیشتر از ۲ به نفع ضایعات بدخیم می‌باشد که این مطلب توسط دیگران نیز بیان شده است (۲۵).

تقدیر و تشکر

لازم است از زحمات و همکاری بیدریغ سرکار خانم ظریف که در رنگ‌آمیزی اسلایدها وسرکار خانم بخشی که در تایپ اولیه این مقاله کوشیده‌اند، تشکر و قدردانی شود.

References

1. Albrechts, Jambrosic J. A., Kahn H. L. *et al.*, 1989, Nucleolar organizer regions in superficial spreading melanoma with nodule, Mod. Pathol., 2(6) : 666 - 70.
2. Bazilai A., Goldberg I., Yulash M. *et al.*, 1998, Silver - stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a prognostic value in malignant melanoma, Am. J. Dermatopathol., 20 (5):473 - 7.
3. Bollicell A. R., Marrandodap J. *et al.*, 1995, Quantitative and qualitative AgNORs rate of prostatic cancer, Pathologicr, 87 : 627 - 630.
4. Ceccarelli C., Trere D., Santini D. *et al.*, 2000, AgNORs in Breast tumor, Micron, 31 (2): 143 - 9.
5. Crocker J., Skilbeck N., 1987, Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quntitative study, J. Clin. Pathol., 40 (8) : 885 - 9.
6. Derizini M., Sirvi V., Trere D. *et al.*, 1994, Nucleolar ogranizer region in tumor cell, The Cancer J., 7 (2) : 70 - 77.
7. Dig Gregorio G., Losi L., Annlessi G. *et al .*, 1991, Nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanocytic nevi : Comparsion of two counting methods, Am. J. Dermatopathol., 13(4) : 329 - 33.
8. Evans A.T., Blessing K., Orrell J. M., 1992, Mitotic indices , anti - PCNA immunostaining , and AgNORs in thick cutaneous melanomas displaying paradoxical behavior, J. Pathol., 168 (1): 15 - 22.
9. Evan R. *et al.*, 1996, Discordance in histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between pathologists, Human pathol., 27 (6) : 528 - 531.
10. Fallowfield M. E., Cook M. G., 1989, The value of nucleolar organizer region staining in the differential diagnosis of borderline melanocytic lesions, Histopathology, 14(3) : 299 - 304.
11. Fogt F. *et al.*, 1995, AgNOR and Ki-67 immunoreactivity in cutaneous melanocytic lesions, Am. J. Dermatopathol., (1) :7-12.
12. Friedman R. J., Grin C. M., Heilman E. *et al.*, 1991, Distinguishing benign and malignant melanocytic lesions with the AgNOR method, Dermatol. Clin., 9 (4): 698 - 93.
13. Gambini C., Casazza S., Borgiani L. *et al.*, 1992, Counting the nucleolar organizer region - associated proteins is a prognostic clue of malignant melanoma, Arch. Dermatol., 128(4):537- 42.
14. Gonzalez A. P., kumar D., Sanchez R. L. *et al.*, 1994, AgNOR area measurements differentiate benign and malignant melanocytic lesions more accurately than simple counting, Am. J. Dermatopathol., 16(4) : 372 -6.
15. Heinisch G., Barth J., 1995, AgNOR expression in skin tumor. Studies of melanocytic , epidermal and fibrohiotiocytic lesions, Hautarzt, 46 (3): 177 - 85.
16. Howat A. J., Giri D. D., Cotton D. W. *et al .*, 1989, Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas, Cancer, 1; 63 (3) : 474 - 8.
17. Howat A. L., Giri D. D., Wright A. L. *et al.*, 1988, Silver - stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma, J. Pathol., 156 (3) : 227 - 32.
18. Jain R., Malhoztav, Kumar N. *et al .*, 1998, NOR in cirrhosis and hepatocellular carcinoma, Trop. Gasteroentrol., 19(3) : 10- 1.
19. Kanoko M., Lieda M., Ichihashi M. *et al.*, 1994, PCNA expression and nucleolar organizer regions in malignant melanoma and nevus cell nevus, Kobe J. Med. Sci, 40 (3 - 4): 107 - 23.
20. Khanna A. K., Giri A. K., Khanna A. *et al.*, 2001, NOR count and subjective AgNOR pattern assessment (SAPA) score in skin tumors, J. Surg. Oncol., 78 (4) : 273 - 8.
21. Leong A. S., Gilhamp, 1989, Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant

www.SID.ir

Archive of SID

melanoma and melanocytic nevi, Hum. Pathol., 20(3) : 257 - 62.
22. Lever's Histopathology of the skin, Philadelphia , 8th edition,Lippincott-Raven, 1997: 667 - 8.
23. Mourad W. A., Setrakian S., Hales M. L., 1994, The AgNOR in ductal carcinoma in situ of the breast, Cancer, 74 (6) : 1739 - 45.
24. Musiatowicz B. D. Z., Eciol J., Augusty Nowicz A., 1998, Over explantation of the NOR in the thyroid follicular tumors, Rocznik Akademii Medycznej W Byalymtoku, 43:186- 193.
25. Nagatani T., Iemoto G., Miyakawa K. *et al.,* 1991, AgNOR staning in malignant melanoma, J. Dermatol., 18(2):731-5.
26. Orrell J. M., Evans A. T., Grant A., 1991, A critical evaluation of AgNOR counting in benign nevi and malignant melanoma, Pathol., 163(3) : 239 - 44.
27. Pfau A., Eckert F., Schropfer T. *et al.,* 1994, Value of nucleolus organizer regions (AgNORs) in dermatologic oncology, Hautarzt, 45 (11) : 762 - 8.
28. Pich A., Chiusa L., Margaria E., 1995, Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis, Cancer Detect. Prev., 19 (3) : 282 - 91.
29. Ronan S. G., Farolan M. S., McDonald A. *et al.,* 1994, Prognostic significance of nucleolar organizer regions (NORs) in malignant melanoma, Cutan. Pathol.,21 (6): 494 - 9.
30. Rosai Ackerman's Surgical Pathology, Missouri, 8 th edition, Mosby, 1996, Vol 1 : 158 - 9.
31. Wvans A. T. *et al.,* 1991, Reevaluation silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions : a study with quantitation and pattern analysis, J. Pathol., 165 (1) : 61 - 7.