ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR در کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه

*دکتر عباسعلی امیدی، دکتر نوریه شریفی

* بخش پاتولوژی بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

هدف از این مطالعه ارزیابی و بررسی ارزش تشخیصی AgNOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Proteins Region) در ضایعات غیرنئوپلازیك و نئوپلازیك بدخیم و درجه بندی‌هیستولوژیك (grading) کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه ، و نشان دادن میزان پراکندگی‌نقاط AgNOR (Distribution Score) ، در هسته سلول‌های غیر نئوپلازیك و نئوپلازیك بدخیم‌اپی‌تلیوم مثانه به عنوان یك شاخص (Marker) مهم تشخیصی در سطح میکروسکوپ نوری است. ۴۹ بلوك پارافینی بافت ، از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان قائم (عج) انتخاب شد که‌شامل:۶ نمونه سیستیت مزمن ، ۵ نمونه کارسینوم سلولهای ترانزیشنال درجه یك ، ۱۵ نمونه‌کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال درجه دو ، ۲۳ نمونه کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال درجه‌سه ، می‌باشند. نقاط AgNOR هستکی را در هسته سلولهای اپی‌تلیال درسیستیت مزمن و کارسینوم سلول‌های‌ترانزیشنال مثانه درجه۱ ، ۲ ، ۳ با میکروسکوپ نوری، از نظر تعداد متوسط در هسته، یکصد سلول ومیزان پراکندگی آنها را ، در هسته یك صد سلول که سه یا بیش از سه نقطه AgNOR داشتند، موردبررسی قرار دادیم. افزایش تدریجی تعداد نقاط شمارش شده و درصد ، سه عدد AgNOR و بیشتر در هسته‌سلول‌های اپی تلیال سیستیت مزمن و کارسینوم مثانه با درجات متفاوت ، به طور معنی داری‌افزایش یافته است. شمارش مناطق رنگ‌پذیر هستکی (AgNOR) و میزان پراکندگی این نقاط بارنگ‌آمیزی نقره دوست ، روشی مناسب ، ساده و ارزان ، برای تمایز ضایعات‌غیرنئوپلازیك و نئوپلازیك بدخیم و همچنین معیاری با ارزش تشخیصی بالا برای درجه‌بندی و تمایز کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه محسوب می‌شود.

کلمات کلیدی: مثانه ، AgNOR ، کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال .

مقدمه

کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه دارای تظاهرات کلینیکی متفاوت و پیش آگهی متغیر وتقریبا غیرقابل پیش بینی می‌باشد (۱). در اغلب موارد درجه‌بندی هیستولوژیك (grade) و مرحله بندی بالینی (staging)، معیارهای اصلی، جهت درمان و پی‌گیری بیماران مبتلا به کارسینوم سلولهای ترانزشیال (TCC ,Transitional cell carcinoma)، می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده معیار دقیقی در تخمین پیش‌آگهی بیماران به شمار نمی‌رود (۶ ، ۱۹). از سوی دیگر در مواردی حتی پاتولوژیست‌های باتجربه با اعمال معیارهای متعدد از جمله میتوز (Mitosis)، آتی پی (Atypical) ، نکروز و بررسی‌مرفولوژی قادر به تصمیم‌گیری قاطعی در رابطه با تمایز و درجه بندی تومورهای سلولهای‌ترانزیشنال مثانه نمی‌باشند. تلاش‌های مستمری به عمل آمده تا با دستیابی به تکنیك‌ها وروش‌های نوین بتوانند گامهای مفید و موثری در این رابطه بردارند. طبق مطالعات اخیر محققین، درجه پرولیفراسیون سلولی را می‌توان با روشهای مختلفی ازجمله فلوسیتومتری ، S-phase fraction ، مرفومتری ، ایمنوهیستوشیمی Ki67 و AgNOR تعیین کرد (۳). تغییرات کروموزومی چون فعال شدن انکوژن (H-Ras) و غیرفعال شدن ژنهای مهاری‌تومور چون P53 و C-erb B2 در تومورهای با درجه بالای مثانه دیده شده است. از سوی دیگرمطالعات ایمنوپاتولوژیك نشان می‌دهند که وجود و افزایش فاکتور اپیدرمال (EGF) در سلولهای‌تومورال مثانه معیار و ملاك خوبی جهت تعیین پیش آگهی و تهاجم عضلات جداری مثانه‌محسوب می‌شود(۹). درطول دهه گذشته مطالعات متعددی در رابطه با فلوسیتومتری DNA و شناخت هستك به‌عنوان معیار مهم نئوپلاسم‌های بدخیم و تعداد و اندازه هستك هر سلول و اتصال آن به مامبران‌مورد توجه قرار گرفته است. فلوسیتومتری

Archive of SID

www.SID.ir

DNA در تومورهـای مثانـه، آنوپلوئیـدی DNA را بـا دامنه(۳۷-۶۶)٪ نشان داده است (۸). به طوری که با افـزایش grading درصد آنوپلوئیدی هم افـزایش‌مـی‌یابـد و در اغلـب مقالات، یك ارتباط مهم بـین عـود بیمـاری در بیمـاران دچـار TCC و آنوپلوئیدیDNA گزارش شده است (۱۰، ۲۰، ۲۱). پارامتر نوظهور AgNOR ، به عنوان شاخص مهم تشخیصـی نئوپلاسمهای بدخیم معرفی شده است (۹، ۱۰).

AgNOR نواحی کروماتینی در هستك بوده که در انتـهای مرحله تلوفاز، هنگام محو هستك در اطراف آن تشـکیل شـده و در حقیقت حامل‌ژن‌های کد کننده rRNA مـی‌باشـند. منـاطق AgNOR بـه عنـوان حلقـه هـایی از DNA هسـتکی ریبوزومی‌محسوب شده و این پروتئین‌های اسیدی به همراه یـك سری از پروتئین‌های غیرهیستونی به طورانتخابی با نقره رنـگ می‌گیرند (۹، ۱۰). در رنگ‌آمیزی با تکنیـك آرژیـر و فیلیـك نقـاط نقـره دوسـت‌از جملـه RNA پلـی مـراز C23 و B23پـروتئین بـه طـور اختصاصـی مشـخص و نمایـان مـی‌شـوند(۲۶). ایـن‌اجـزاء هسـتکی را NOR اینترفـاز و پروتئین‌های غیرهیستونی نقـره دوسـت را کـه بـا نقـره رنـگ می‌گیرند، پروتئین‌های AgNOR می‌نامند (۹، ۱۰). تعـداد و اندازه نقاط AgNOR با پرولیفراسیون وتقسیم سلولی ارتبـاط مسـتقیم داشـته (۱۱، ۱۲، ۱۴، ۲۰) و نشـان دهنـده فعالیـت کروموزومی ، پلی پلوئیدی و وضعیت تقسیم و تکـثیر سـلولی است. از این جهت امروزه AgNOR به عنوان شاخص مهمـی در تمایز نئوپلاسم‌های خـوش خـیم و بـدخیم و حـق تمـایز بـین درجه‌های مختلف نئوپلاسم‌ها ، محسوب می‌شود (۱۱، ۱۳).

با توجه به این یافته‌های امید بخش بر آن شدیم تا ضایعات خوش خیم و بدخیم و درجه‌های‌مختلف کارسـینوم بـا سـلولهای ترانزیشنال مثانه موجود در بخـش پـاتولوژی بیمارسـتان قـائم مشهد را به روش AgNORs مورد ارزشیابی قرار دهیم.

مواد و روش کار

نمونه‌ها : ۴۹ نمونه بلوك پارافینی بخـش پـاتولوژی بیمارسـتان قـائم (عـج) شـامل :۶نمونـه سیسـتیت مـزمن مثانـه ، ۵ نمونـه کارسینومای با سلولهای ترانزیشنال مثانـه درجـه I ، ۱۵ نمونـه کارسینومای با سلولهای ترانزیشنال مثانه درجـه II ، ۲۳ نمونـه کارسینومای با سلولهای ترانزیشنال مثانـه درجـه III انتخـاب شد و پس از بازبینی اسلایدها توسط دوپاتولوژیست براسـاس معیارهای ارائه شده توسط WHOدرجه بندی شده و دو برش به ضخامت میکرون از هر بلوك پارافینی تهیه و یکی از برشـها بـه روش هماتوکسـیلین ، ائـوزین و بـرش دیگـر بـا تکنیـك آرژیروفیلیك رنگ‌آمیزی شدند.

روش رنگ‌آمیزی : بعد از پارافین‌گیری اسلایدها و هیدراتـه نمودن آنها ، محلول تازه AgNOR بر روی اسلایدها ریختـه و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرارداده شد، پس از رنگ‌آمیزی زمینـه بـا (Neutral Red) جهـت شـمارش نقـاط AgNOR هسـتکی، منـاطق مناسـب هـر اسـلاید، از نظـر کیفیت‌رنگ‌آمیزی و هیستولوژیك انتخاب شـدند. بـه عبـارت دیگر مناطقی که دارای معیارهای تشخیصی‌دقیق‌تری برای هر اسلاید بوده، انتخاب شد و هر نمونه با درشت نمایی هزار مـورد بررسی‌میکروسکپی قرار گرفتند (۱۰ ، ۱۵ ، ۱۶).

روش ارزیابی: یك صد سـلول از اپـی تلیـوم تمـام نمونـه‌هـای سیستیت مزمن مثانه و کارسینوم سلولهای‌ترانزیشـنال درجـهI، II ، III را بـه طـور تصـادفی انتخـاب نمـوده و بـا درشـت نمایی ۱۰۰۰ نقاط AgNOR شمارش شد.

برای مشخص کـردن (Distribution score) یـك صـد سلول از نمونه‌های ذکرشده که سه و بیش از سه نقطـه AgNOR داشتند، شمارش شد.

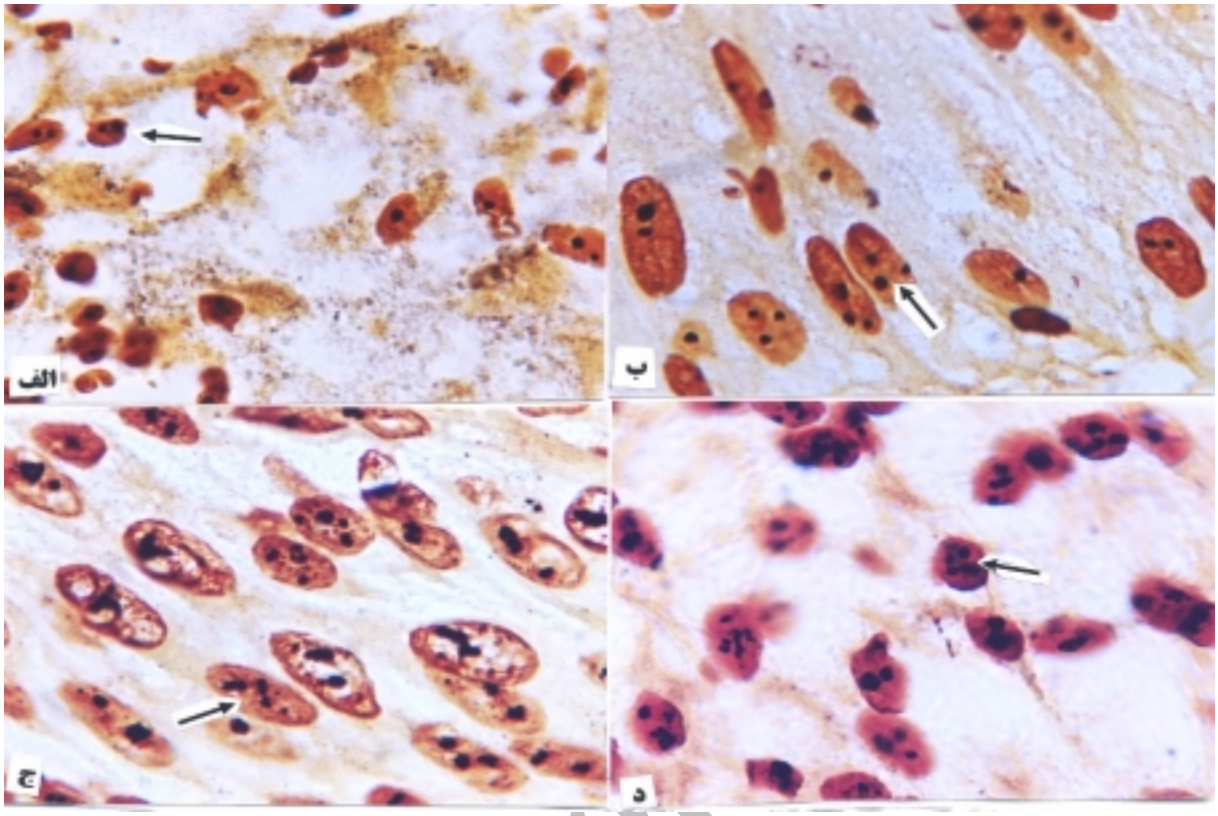
ارزیـابی اطلاعـات : بـرای ارزیـابی تعـداد متوسـط و میـزان پراکندگی نقاط AgNOR در سیستیت مزمن مثانه ،کارسـینو سـلولهای مثانـه درجـه I ، II ، III ، از آزمـون ANOVA استفاده شد که P<۰/۰۵ اختلاف معـنی داری بـه ترتیـب بـین گروههای چهارگانه نشان داد (جدول۱ و ۲ و نمودار ۱ و ۲).

نتایج

تعداد نقاط AgNOR هسـتکی شـمارش شـده بـا افـزایش درجه هیستولوژیك افزایش‌یافته ، به طوری که میانگین تعداد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: **الف:**تعداد متوسط نقاط AgNOR درهسته سلولهای اپی تلیال مثانه در سیستیت مزمن، **ب:** درهسته سلولهای کارسینوم ترانزیشنال‌مثانه درجه یک، **ج:** درهسته سلولهای کارسینوم ترانزیشنال‌مثانه درجه دو، **د:** درهسته سلولهای کاسینوم ترانزیشنال‌مثانه درجه سه (درشت نمایی×۱۰۰۰).

جدول ۱ : میانگین تعداد متوسط نقاط AgNOR (±SD) در سیستیت مزمن و کارسینوم باسلول های ترانزیشنال مثانه ، درجه ۱ و ۲ و ۳

گروه تشخیصی	تعداد موارد	تعداد متوسط نقاط AgNOR	SD	Variance	PV
سیستیت مزمن	۶	۲/۹۳	۰/۵۷	۰/۳۳	<۰/۰۵
TCC I	۵	۳/۵۶	۰/۲۳	۰/۰۵	<۰/۰۵
TCC II	۱۵	۴/۴۵	۰/۳۴	۰/۱۲	<۰/۰۵
TCC III	۲۳	۵/۸۳	۰/۷۷	۰/۶	<۰/۰۵

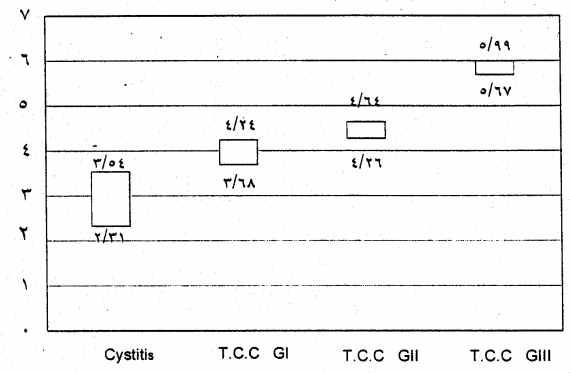
جدول ۲ : میانگین تعداد درصد متوسط نقاط AgNOR (±SD) هستکی و یا بیشتر در سلولهای اپی تلیال در سیستیت مزمن و کارسینوم با سلول های ترانزیشنال مثانه ، درجه ۱ و ۲ و ۳

گروه تشخیصی	تعداد موارد	تعداد متوسط نقاط AgNOR	SD	Variance	PV
سیستیت مزمن	۶	۰/۸	۰/۲۵	۰/۰۶	<۰/۰۵
TCC I	۵	۳/۸۸	۰/۵۲	۰/۲۷	<۰/۰۵
TCC II	۱۵	۶/۹	۱/۵	۲/۲۵	<۰/۰۵
TCC III	۲۳	۳۲/۴۳	۱۱/۷۸	۱۳۸/۷	<۰/۰۵

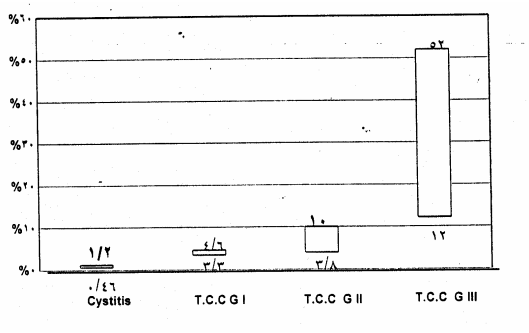
Archive of SID

www.SID.ir

نقاط AgNOR شمارش شده ، در سلولهای اپی‌تلیال در جریان سیستیت مزمن ۲/۳۹ ، و کارسینومای سلولهای ترانزیشنال درجه۱ ، ۲ ، ۳ به ترتیب۳/۶۵ ، ۴/۵۴و ۵/۲۸ عدد می‌باشد (جدول۱ ، نمودار۱) ، شکل(۱) درصد سلولهایی که سه عدد AgNOR هستکی یا بیشتر را داشته‌اند عبارتند از ، اپی تلیوم سلولهای ترانزیشنال سیستیت مزمن۰/۸٪، کارسینوم با سلول ترانزیشنال درجه یك۸۸/۳٪ ، کارسینوم با سلول ترانزیشنال درجه دو ۹/۶٪ ،کارسینوم با سلول ترانزیشنال درجه سه۴۳/۳۲٪ می‌باشند که یك افزایش آماری معنی‌داری را (P<۰/۰۵) بین گروه های چهارگانه نشان می دهد (جدول۲ و نمودار ۲). مسئله دیگر اینکه نقاط AgNOR داخل هسته در سیستیت مزمن اغلب جایگزینی مرکزی داشته و در ضایعات بدخیم اغلب به صورت نامنظم و حاشیه‌ای قرار گرفته‌اند.



نمودار ۱ : میزان پراکندگی نقاط AgNOR در هسته سلولهای اپی تلیال سیستیت مزمن ، کارسینوم با سلولهای ترانزیشنال درجه ۱ و ۲ و ۳



نمودار۲: دامنه درصد متوسط AgNOR هستکی و بیشتر در هسته سلول های اپی تلیال سیستیت مزمن و کارسینوم با سلولهای ترانزیشنال درجه ۱و۲و۳

بحث

کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه۹۰٪ بدخیمی‌های مثانه را تشکیل می‌دهد (۱) که در۸۰٪ - ۷۰٪ موارد از نوع سطحی بوده و در ۷۰٪ بیماران منجر به عود می‌شود (۵،۴) .

یکی از روشهای نوین تشخیصی ابداع شده ، رنگ‌آمیزی AgNOR یا مناطق هستکی نقره‌دوست هسته سلول هاست (۲ ، ۵ ، ۹) که با استفاده از ترکیبات نقره تا حدامکان تخمین دقیقی از درجه‌بندی و به دنبال آن پیش‌آگهی کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه در اختیار ما می‌گذارد.

در این مطالعه ، با انجام رنگ‌آمیزی AgNOR و دستیابی به نتایج قابل توجه می‌توان درجه بندی‌کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال مثانه را دقیق‌تر انجام داده و با توجه به این مسئله‌که با افزایش درجه، خطر عود و پیشرفت کارسینوم سلولهای ترانزیشنال مثانه بیشتر می‌شود، پیش آگهی و روش‌های درمانی مناسب‌تری را برای بیماران پیشنهاد نمود.

در طول دهه گذشته ، با مطالعه تومورهای متفاوت با استفاده از تکنیك AgNOR نشان داده شده‌است که AgNOR هستکی با پرولیفراسیون و تقسیم سلولی ارتباط مستقیم (۱۱ ، ۱۲ ، ۱۴) داشته وشاخص مهمی در تمایز و عود و پیش آگهی نئوپلاسم ارگانهای مختلف (۵، ۹، ۱۳، ۲۰، ۲۱) از جمله نئوپلاسم‌های تیروئید (۲۳، ۲۴)، ریه (۲۲) و پروستات (۱۸ ، ۲۱) می‌باشد.

در مطالعه حاضر تعداد نقاط شمارش شده در هسته یکصد سلول پوششی سیستیت مزمن و TCCدرجه I و II و III ، که سه نقطه AgNOR هستکی و یا بیشتر را داشته‌اند به ترتیب۰/۸٪ ، ۸۸ /۳٪، ۶/۹٪ و ۳۲٪ می‌باشند. به عبارت دیگر سلولهای TCCدرجه III ، ۶/۳۶ برابر TCC درجه II وسلولهای TCCدرجه II ۱/۷۷ برابر TCC درجه I و TCCدرجه I ، ۴/۵۸ برابر سلولهای اپی‌تلیوم التهابی مثانه، دارای سه نقطه AgNOR و بیشتر را داشته‌اند.

مطالعات متعددی(۱۲ ، ۱۳ ، ۲۵) نشان داده‌اند که افزایش تعداد نقاط AgNOR هستکی به موازات‌افزایش درجه کارسینوم با سلولهای ترانزیشنال مثانه رابطه معنی دار داشته

Archive of SID

www.SID.ir

که یافته‌های ما نیزنتایج گذشته را تائید می‌کنند. با توجه به نتایج به دست آمده ، معتقدیم که با استفاده از رنگ‌آمیزی AgNOR هستکی می‌توانیم کارسینوم سلولهای ترانزیشیال مثانه را با دقت کافی از نظر درجه بندی‌هیستولوژیك از هم متمایز نموده و اعتقاد مبرم داریم که Distribution score یعنی درصدسلولهائی که سه نقطه AgNOR یا بیشتردر هسته سلول دارند با ارزش‌ترین معیار تشخیصی،در ضایعات غیرنئوپلازیك و نئوپلازیك مثانه ، و همچنین تمایز و درجه بندی کارسینوم سلولهای ترانزیشیال می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از سرکار خانم دکتر فاتحی، جناب آقای دکتر غفار زادگان، جناب آقای دکتر غفاری منش که در تدوین این مقاله همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Ceccarelli C., Trere D., Santini D. *et al.*, 2000, AgNORs in breast tumor, Micron, 31(2), 143-9.
2. Crocker J., Nar P., 1987, Nucleolar organizer regions in lymphomas., J. Pathol., 151, 111-118.
3. Campanella R., Russo A., Plaja S., Bazan V., Pavone C., Corselli G., Pavone-Macaluso M., 1992, Study of cellular DNA content by flow cytometry in primary bladder carcinomas, Dur Urol., 21:58-63.
4. Derenzini M., Pession A., Farabegoli F., Trere D., Badiali M., Dehan P., 1989, Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two-neuroblastoma cell, Am. J. Pathol., 134:925-932.
5. Derenzini M., Ploton D., 1992, Interphase nuclear organizer region in cancer cells, Int. Rev. Exp. Pathol., 32:150-192.
6. Derenzini M., Trere D., Pession A., *et al.*, 1991, Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissue, J. Path., (2): 181-6.
7. Derenzini M., Sirri V., Trere D., 1994, Nucleolar organizer regions in tumor cells, Cancer J., 7(2): 1-9.
8. Di Silverio F., Von Heland M., De Berardinis E., Izzi R., Buscarini M., De Vita R., Forte R., Sec Careccia F., Menotti A., 1992, Prognostic role of flow cytometry in superficial bladder cancer, Eur. Urol., 21 (suppl 1):22-25.
9. Eminovic-Behrem S., Trobonjaca Z., Petroveki M., *et al.*, 2000, Prognostic significant of DNA ploidy pattern and nucleolar organizer region in colorectal carcinoma, Croat. Med., 41(2): 154-8.
10. Fradet Y., 1992, Markers of prognosis in superficial bladder cancer, Semin. Urol., 10:28-38.
11. Hug E. B., Donnelly S. M., Shipley W. U., Heney N. M., Kaufman D. S., Preffer F. I., Schwartz S. M., Colvin R. B., Althausen A. F., 1992, Deoxyribonucleis acid flow cytometry in invasive bladder carcinoma; a possible predictor for successful bladder preservation following trans urethral surgery and chemotherapy radiotherapy, J. Urol.,148:47-51.
12. Hernandez Verdum B., 1983, The nucleolar organizer regions, Biol. Cell, 49:191-202.
13. Jain R., Malhorta V., Kumar N., *et al.*, 1998, Nucleolar organizer regions in cirrhosis and hepato- cellular carcinoma, Trop. Gastroentrol., 19(3): 100-1.
14. Kavasaki F., Onoda N., Ishikawat *et al.*, 2000, Evaluation of (AgNOR) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence, Oncol. Rev., 7(4), 853-7.
15. Kaneco M., Anhiro K., Fuji S., *et al.*, 1995, The proliferative activity in epithelial hyperplasia of the breast, 221:46-51.
16. Lamm D. L., Griffith G., Pettit L. L., Nseyo U. O., 1992, Current perspectives on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer, Urol., 93:301-308.
17. Lipponen P. K., 1992, Review of cytometric methods in the assessment of prognosis in transitional cell bladder cancer, Eur. Urol., 21:177-183.
18. Mukherjee J., Misra V., Guptase *et al.*, 1997, AgNORs in atypical adenomatose hyperplasia, prostatic intra epithelial neoplasia and prostatic carcinoma, Urol. Int., 58(2): 75-9.
19. Musiatowicz B., Eciol D. Z., Augusty J., Nowicz A., 1998, Over explanation of the nucleolar organizer region in the thyroid follicular tumors, Rocznik Akademii Medycznej Wbialymstoku, 43:186-193.
20. Mourad V. A., Vallieres E., Chuen J., *et al.*, 1997, Cell kinetics analysis of surgical resected non-small lung cancer, Ann. Saudi Med., 17(2): 161-166.
21. Nairn E. R., Crocker J., McGovern J., 1988, Limited value of AgNOR enumeration in assessment of thyroid neoplasm [letter], Clin. Patho., 41:1136.
22. Ogava Y., Chung Y. S., Nakta B., *et al.*, 1993, Evaluation of Argyrophilic nucleolar

Archive of SID

www.SID.ir

organizer regions in breast cancer, Ann. Can. Res. Ther., 3:109-112.

23. Ploton D., Menager M., Jeanne son P., *et al.*, 1986, Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the topical level, Histochem. J., 18:5-14.

24. Saracino G. A., Ditonno P., Disabato G., Traficante A., Battaglia M., Lucivero G., Selvag F. P., 1992, Prediction of recurrence and progression in primary superficial cancer with DNA flowcytometry, Eur. Urol., 21(suppl 1): 26-30.

25. Tingjie M., Ze W., Nianli S., Rucheng X., Shilong C., 1992, Clinical significance of flow cytometric deoxyribonucleic acid measurements of deparafinized specimens in bladder tumors, Eur. Urol., 21:98-102.

26. Witjes J. A., Kiemeney L., Osterhof G., Debruyne F., 1992, Prognostic factors in superficial bladder cancer, Eur. Urol., 21:89-97.

27. Zaczek M., Szot W., Chlap Z., 1996, Argirophilic nucleolar organizer regions in proliferative lesion of the thyroid gland, Anal. Cytol. Hist., 18(1): 1-8.

Archive of SID

www.SID.ir