Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

بررسی ارزش رنگ‌آمیزی AgNOR در تفکیک تومورهای حد واسط موسینوس و سروز تخمدان از انواع خوش‌خیم و بدخیم آنها

دکتر شیرین لطفی‌نژاد [۱]، دکتر مجید میلانی [۲]، دکتر سید بهروز محسنی‌مقدم [۳]، دکتر شاکر سالاری [۴]

چکیده

پیش زمینه و هدف : افتراق تومورهای حد واسط سروز و موسینوس تخمدان از انواع خوش‌خیم و بدخیم آنها با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های روتین هیستوپاتولوژیک در بعضی موارد بسیار دشوار بوده وگاهی امکان‌ناپذیر است. در این مطالعه ارزش رنگ‌آمیزی AgNOR جهت افتراق این تومورها از یکدیگر بررسی شده است .

مواد و روش : برای دستیابی به این هدف از دو معیار کمی mAgNOR (متوسط تعداد AgNORها در هسته) که با پلوئیدی سلول در ارتباط است و pAgNOR (درصد سلول‌های دارای ۵ یا بیشتر AgNOR در هسته) که با پرولیفراسیون سلول‌ها ارتباط دارد، استفاده شده است. ۴۶ تومور سروزی شامل ۱۵ تومور خوش خیم، ۱۳ تومور حد واسط و ۱۸ تومور بدخیم و نیز ۳۶ تومور موسینوس شامل ۱۵ تومور خوش خیم، ۱۲ تومور حد واسط و ۹ تومور بدخیم انتخاب گردید و مقاطع برداشته شده از بلوکهای پارافینی آنها به‌دو روش هماتوکسیلین و ائوزین و AgNOR رنگ‌آمیزی شده، از هر تومور صد سلول از نظر تعداد AgNORهای هسته شمارش گردیدند.

یافته‌ها : در هر دوگروه تومورهای سروز و موسینوس، افزایش معنی‌دار mAgNOR و pAgNOR از تومورهای خوش‌خیم به حد واسط و از تومور حد واسط به تومور بدخیم وجود داشت و به‌جز دو مورد تومور حد واسط موسینوس که در pAgNOR با نوع خوش‌خیم هم‌پوشانی داشتند، هیچگونه هم‌پوشانی دیگری در بین گروه‌ها وجود نداشت .

بحث و نتیجه‌گیری : این مطالعه نشان می‌دهد که شمارش NORها می‌تواند معیار با ارزشی برای تشخیص افتراقی تومورهای حد واسط سروز و موسینوس تخمدان از انواع خوش‌خیم و بدخیم آنها باشد.

گل واژگان: AgNOR ، تخمدان ، تومورهای سروز ، تومورهای موسینوس ، رنگ‌آمیزی هیستوشیمی

مجلهٔ پزشکی ارومیه ، سال چهاردهم ، شمارهٔ دوم ، ص ۹۷ - ۹۱، تابستان ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه: ارومیه ، خیابان ارشاد بیمارستان امام خمینی ، گروه پاتولوژی ، دکترسیدبهروز محسنی‌مقدم

۱ - استادیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۲ - استادیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۳ - دستیار پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۴ - استادیار گروه اپیدمیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تـومورهای اپـی‌تلیال تـخمدان حـدود دو سـوم از تـمام نئوپلاسم‌های تخمدان را شامل شده و انـواع بـدخیم آنـها هـم حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد تمام کارسینوم‌های تخمدان را تشکیل مـی‌دهد (۱ و ۲). نـئوپلاسم‌های حـد واسـط، گـروه مـهمّی از تومورهای اپی‌تلیالی تخمدان هستند کـه در مـقایسه بـا انـواع بـدخیم آنـها کـه بـالتین مـیزان مـرگ و مـیر مـوردی را در بدخیمی‌های زنان دارند، معمولاً با پـیش‌آگـهی بسـیار خـوب همراه می‌باشند، اگر چه بندرت رفتار تهاجمی داشته ، به صفاق گسترش یافته و حتی تغییر واضح بدخیمی پیدا می‌کنند (۱ و ۳). مهمترین معیار افتراق تومورهای حد واسط [1] از ادنـوکارسینوم تخمدان، عدم تهاجم به استرومای زیرین است (۱ و ۴ و ٦). در بسیاری از موارد مشخص نمودن این تهاجم بسیار دشوار بوده و افـتراق ایـن تـومورها بـا مشکـل مـواجـه مـی‌شود. مـناطق سازماندهنده هستگی [2] حلقه‌هایی از DNA بوده که برای ساخت RNA ریـبوزومی تـرجـمه مـی‌شود. بـه‌همراه ایـن مـناطق، پروتئین‌های اسیدی نقره‌دوست وجود دارند که با رنگ‌آمیزی کلوئید نقره به‌صورت نـقاط تـیره رنگ (AgNOR) مشـخص می‌گردند (۹ و ۷).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که معیارهای کـمی AgNOR بـا سرعت تکثیر و پلوئیدی تومور و حتی پیش‌آگهی تومورهای بدخیم ارتباط دارند (۱۰ و ۱۹).

در این مطالعه رنگ‌آمیزی AgNOR روی مقاطع برش داده شده از بلوک‌های پارافینی تومورهای سروز [3] و موسینوس [4] تخمدان انجام گرفته است تا توانـایی ایـن روش در افـتراق تـومورهای حدواسط تخمدان از انـواع خـوش‌خیم و بـدخیم خـود مـورد ارزیابی قرار گیرد. برای دستیابی به‌این هـدف، دو مـعیار کـمی mAgNOR (متوسط تعداد AgNORها در هسته) که با پلوئیدی در ارتـباط است و pAgNOR (درصـد هسـته‌های دارای ۵ یـا بیشتر AgNOR) که با پرولیفراسیون تومور ارتباط دارد (۲۰ و ۱۸) مورد سنجش قرار گرفته‌اند .

مواد و روش

جهت انجام مـطالعه ۲۷ کـارسینوم تـخمدان (۱۸ سـروز و ۹ موسینوس)، ۲۵ تومور حد واسط تـخمدان (۱۳ سـروز و ۱۲ موسینوس) و ۳۰ تومور خوش خیم تخمدان (۱۵ سروز و ۱۵ موسینوس) انتخاب گردید. تمامی نمونه‌ها در فرمالین fix شده و در پارافین بلوک‌گیری شده بودند.

از هر بلوک پارافینی دو برش به ضخامت ۴ میکرومترتهیه شده، یکی با رنگ‌آمیزی H & E جهت تایید تشخیص و دیگری با کـلوئید نـقره جـهت شـمارش AgNORs رنگ‌آمـیزی شـدند. مطالعه میکروسکوپیک و تشخیص نـمونه‌ها قـبلاً تـوسط دو مشاهده‌گر، داده می‌شد.

در روش رنگ‌آمیزی AgNOR ، پس از پارافینی زدایی در گزیلن و آب‌دهی، لام‌ها در محلول ترکیبی نیترات نقره ۵۰ درصد (۲ حـجم) و مـحلول دو درصـد ژلاتـین بـه‌همراه ۱ درصـد اسیدفورمیک (۱ حجم) در محیط تاریک به مدت ۵۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس برش‌ها در آب مقطر به مدت دو دقیقه شستشو گردیده ، پس از قرارگیری به‌مدت ۵ دقیقه در محلول تیوسولفات ۵ درصد (جهت تثبیت رنگ‌آمـیزی) ، بـه روش معمول آب‌گیری، شفاف سازی و مـونته شـدند. بـعد از رنگ‌آمیزی ، تعداد AgNORs که به‌صورت نقاط تیره در هسته سلول مشخص می‌گردند در ۱۰۰ سلول از هر برش که بـه‌طور تصادفی انتخاب می‌شدند ، با بـزرگنمائی ۱۰۰ × (بـا عـدسی روغنی) شمارش گردیدند.

در این مطالعه تمام AgNORهای درون هسته شمارش گردیده

---

1. Borderline tumors
2. NORs
3. Serous tumors
4. Mucinous tumors

www.SID.ir

Archive of SID

و در موارد وجود Cluster و doublet در صورت قابل تفکیک بوده اجزای آنها ، به صورت شمارش تمام اجزا و در صورت عدم توانایی تفکیک و نیز هموژن بودن هستک ، یک AgNOR در نظر گرفته شدند.

تفاوت مقادیر mAgNOR و pAgNOR بین تومورهای خوش‌خیم ، حد واسط و بدخیم سروز و موسینوس تخمدان به‌تفکیک در دو گروه با آنالیز یک متغیری (ANOVA) مورد سنجش قرار گرفته و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها ، جهت مشخص نمودن سطحی از متغیرها که تفاوت در آن معنی‌دار است Tukeys test انجام پذیرفت .

نتایج

در تومورهای سروز تخمدان ، mAgNOR در انواع خوش‌خیم، حد واسط و بدخیم به‌ترتیب ۱/۴۹ ، ۳/۱۱ و ۶/۸۸ در هسته و pAgNOR به‌ترتیب ۰/۶ ، ۱۹/۰۷ و ۷۹/۲۰ درصد می‌باشد (جدول شماره ۱). همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود هیچ‌گونه همپوشانی در mAgNOR و pAgNOR وجود ندارد.

در تومورهای موسینوس تخمدان ، mAgNOR در انواع خوش‌خیم ، حدواسط و بدخیم به‌ترتیب ۱/۶۳ ، ۳/۲۷ و ۶/۵۸ در هسته و pAgNOR به‌ترتیب ۱/۷۳، ۱۸/۶۶ و ۷۴/۱۱ درصد می‌باشد (جدول شماره ۲). به‌جز دو مورد همپوشانی در pAgNOR بین تومور موسینوس خوش‌خیم و حدواسط ، هیچ‌گونه همپوشانی دیگری بین گروه‌ها وجود نداشت. از آن‌جایی‌که تومورهای خوش‌خیم ، حدواسط و بدخیم از نظر معیارهای mAgNOR و pAgNOR کاملاً از یکدیگر مجزا بودند، آنالیز افتراقی[1] جایی در مطالعه ما پیدا نکرد و اساساً نیاز به آن وجود نداشت .

نکتهٔ جالب توجه دیگر عدم وجود سلولی با بیش از ۱۰ AgNOR در تومورهای حدواسط بود. تومورهای دارای سلول‌هایی با بیش از این تعداد AgNOR در هسته (حتی بالای ۲۰ AgNOR در هسته) در گروه تومورهای بدخیم جای می‌گرفت و در مجموع در نمای میکروسکوپی هم تفاوت آشکاری بین تومورهای حدواسط با انواع خوش‌خیم و بدخیم از نظر تعدا ، اندازه و شکل AgNORها در هسته وجود داشت (شکل ۱ و ۲) .

جدول شماره ۱ : mAgNOR و pAgNOR در تومورهای سروزی تخمدان

	N	mAgNOR (mean ± S.D.)	pAgNOR (mean ± S.D.)
S.C. *	۱۵	۱/۴۹ ± ۰/۲۶	۰/۶ ± ۰/۹۸
B.S.T. **	۱۳	۳/۱۱ ± ۰/۵۰	۱۹/۰۷ ± ۹/۲۹
I.S.C. ***	۱۸	۶/۸۸ ± ۱/۳۴	۷۹/۲۰ ± ۱۳/۹۰

* S.C. : Serous Cystadenoma

** B.S.T. : Border line serous tumors

*** I.S.T. : Invasive serous cystadenocarcinoma

جدول شماره ۲ : mAgNOR و pAgNOR در تومورهای موسینوسی تخمدان

	N	mAgNOR (mean ± S.D.)	pAgNOR (mean ± S.D.)
M.C. *	۱۵	۱/۶۳ ± ۰/۱۱	۱/۷۳ ± ۲/۹۳
B.M.T. **	۱۲	۳/۲۷ ± ۰/۳۸	۱۸/۶۶ ± ۹/۸۱
I.M.C. ***	۹	۶/۵۸ ± ۱/۰۵	۷۴/۱۱ ± ۱۳/۵۰

* M.C. : Mucinous Cystadenoma

** B.S.T. : Border mucinous tumors

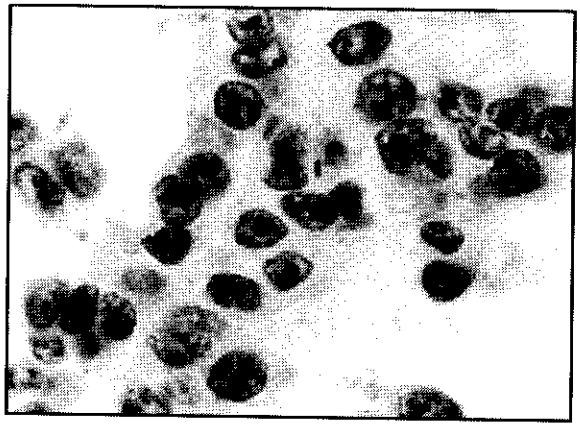
*** I.S.T. : Invasive mucinous cystadenocarcinoma

1. Discriminant Analysis

www.SID.ir

Archive of SID

شکل شماره ۱ : رنگ‌آمیزی AgNOR در تومور سروزی حدواسط تخمدان. سلولها دارای AgNORهای بزرگتر و متعددتری نسبت به تومور خوش‌خیم می‌باشند.



شکل شماره ۲ : رنگ‌آمیزی AgNOR در تومور سروزی بدخیم تخمدان. سلولها دارای AgNORهای نامنظم و به تعداد زیاد می‌باشند.

بحث

با توجه به مشکلات تشخیصی که در رنگ‌آمیزی‌های معمول جهت افتراق تومورهای حدواسط سروز و موسینوس تخمدان از انواع خوش‌خیم و بدخیم وجود دارد، مطالعاتی در مراکز مختلف جهان در جهت استفاده از رنگ‌آمیزی AgNOR برای افتراق این تومورها انجام گرفته است ، که مطالعهٔ ما نیز از این دست می‌باشد .

این مطالعه براساس دو نوع معیار کمی (mAgNOR, pAgNOR) AgNOR صورت گرفته است و نشان داده شد که در هر دو دسته تومورهای موسینوس و سروز تخمدان افزایش معنی‌دار mAgNOR و pAgNOR از تومور خوش‌خیم به حد واسط و از تومور حدواسط به تومور بدخیم وجود دارد و به‌جز دو تومور از گروه موسینوس خوش‌خیم و حدواسط که در pAgNOR با یکدیگر همپوشانی داشتند، در بقیه موارد هیچگونه همپوشانی وجود نداشت و این بدان معنی است که تومورهای حد واسط از نظر هر دو متغیر فوق کاملاً از انواع خوش‌خیم و بدخیم خود متمایز می‌باشند .

در بعضی مطالعات همچون مطالعهٔ خاتک [1] و همکارانش (۶)، علیرغم معنی‌دار بودن تفاوت mAgNOR بین آدنوم و تومور حد واسط از تومور بدخیم، به‌علت وجود موارد Overlap بین داده‌ها، آنالیز افتراقی انجام پذیرفته است ولی در مطالعهٔ ما به‌علت عدم وجود همپوشانی بین گروه‌ها ، نتایج کاملاً واضح بوده و اساساً نیازی به آنالیز افتراقی نیست .

با مقایسهٔ ارقام mAgNOR و pAgNOR در مطالعات مختلف متوجه تفاوت آنها شده که در بعضی موارد این تفاوت‌ها بسیار فاحش است .

علت اصلی اختلاف بین نتایج ، تفاوت روش شمارش AgNORها در هسته می‌باشد. در رنگ‌آمیزی این نقاط گاهی

1. *Khattech*

www.SID.ir

Archive of SID

هستک سلول با NORهای متعدد، به‌صورت نسبتاً هموژن رنگ می‌گیرد و به‌صورت یک تودهٔ رنگ شدهٔ بزرگ خود را نشان می‌دهد و یا این نقاسی به‌طور تقریبی به یکدیگر چسبیده و یک Cluster را ایجاد می‌نمایند که در بعضی مطالعات این Clusterها را به‌عنوان یک AgNOR در نظر می‌گیرند.

از طرف دیگر گاهی NORها به‌صورت نقاط تیره رنگ بسیار کوچک (کوچکتر از یک میکرون) خود را نشان می‌دهند که بعضی محققین در شمارش خود این نقاط را در نظر نگرفته و نقاط بزرگتر از یک میکرون را شمارش می‌کنند. واضح است که در صورت شمارش NORها به‌روش فوق ، اعداد کوچکتری به‌دست می‌آیند. ولی در همین تحقیقات نیز همچون مطالعهٔ دکتر حاتک (٦) که mAgNOR برای سه نوع تومور خوش‌خیم ، نوع تومور به‌دست آمده و توانایی mAgNOR با کمترین میزان Overalp در جدایی سه نوع تومور فوق از یکدیگر به اثبات رسیده است (در این مطالعه تومورهای سروز و موسینوس به تفکیک بررسی نشده است) .

در مطالعهٔ دکتر موری[1] و همکارانش (۲۰) که بر روی تومورهای موسینوس تخمدان صورت گرفته است، AgNORها به دو گروه بزرگ با قطر بالای یک میکرومتر و کوچک تقسیم شده‌اند و شمارش براساس نقاط کوچک ، نقاط بزرگ و مجموع آنها شده است. در شمارش نقاط کوچک و بزرگ به تفکیک، اعداد کوچکتری به‌دست آمده است ولی در شمارش مجموع نقاط کوچک و بزرگ به میانگین‌های mAgNOR زیر دست یافته : ۰/۱۵ ± ۱/۶۳ (خوش‌خیم) ۰/۸۴ ± ۶/۹۰ (حد واسط) و ۱/۳۰ ± ۹/۳۲ (بدخیم). در هر سه نوع شمارش نقاط کوچک ، بزرگ و مجوع ، تفاوت معنی‌دار بین تومورهای حدواسط با انواع خوش‌خیم و بدخیم خود به اثبات رسیده است ولی به‌علت هم‌پوشانی‌های به‌دست آمده تفکیک تومورها به‌صورت انفرادی ارزش محدودی داشته است. البته به‌علت کمی تعداد نمونهٔ این مطالعه ، ایشان توصیه به انجام مطالعات بیشتر با تعداد نمونهٔ بیشتر نموده‌اند.

در مطالعهٔ ما ، NORهای کوچک و بزرگ همگی شمارش شده و در موارد وجود Clusterها و doubletها در صورت قابل تفکیک بودن اجزای آنها به صورت شمارش تمام آنها و در صورت عدم توانائی تفکیک و نیز هموژن بودن هستک ، یک NOR در نظر گرفته شدند. این روش شمارش ، شباهت بسیاری به‌روش شمارش دکتر ماراد[2] و همکارانش که بر روی ضایعات پستان تحقیق کرده‌اند ، دارد (۱۵) .

با این روش شماره ، اندکس‌های AgNOR نزدیک به مطالعهٔ دکترقاضی زاده و همکارانش (۱۳) به‌دست آمده است که mAgNOR و pAgNOR را برای تومورهای خوش‌خیم ۰/۷۵ ± ۱/۸۳ در هسته و ۱/۹۴ ± ۳/۱۶ درصد و برای تومورهای بدخیم سروز ۲/۹۰ ± ۷/۴۰ در هسته و ۲۲/۵۸ ± ۴۵/۴۰ درصد و برای تومورهای بدخیم موسینوس ۳/۰۱ ± ۷/۰۷ در هسته و ۲۳/۰۵ ± ۴۰/۷۶ درصد به‌دست آورده‌اند. به‌نظر می‌رسد با این روش شمارش AgNORها و دقت زیاد در صحت انجام آن، همان‌طورکه در نتایج مطالعهٔ ما منعکس گردیده است به‌راحتی بتوان از رنگ‌آمیزی AgNOR در افتراق تومور حدواسط از انواع بدخیم و خوش‌خیم خود اقدام نمود و آن را به‌عنوان یک روش روتین در آزمایشگاه‌های کشورمان به‌اجرا در آورد .

پیشنهادات :

با توجه به‌نتایج متفاوت به‌دست آمده در مطالعات مختلف توصیه می‌گردد که از یک روش رنگ‌آمیزی و شمارش AgNOR که بهترین نتیجه را به‌دست آورده است در مراکز کشور استفاده شود تا با اطمینان خاطر به‌توان از آن جهت تشخیص تومورهایی که در خوش‌خیم، حدواسط و بدخیم بودن آنها در

1. Mauri
2. Maurad

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی‌های روتین قطعی هیستوپاتولوژیک ، اتفاق نظر وجود ندارد ، استفاده نمود.

با عنایت به‌این مطلب که روش فوق بسیار ارزان و در دسترس تمام مراکز آسیب‌شناسی کشور می‌باشد ، توصیه می‌شود که از آن به‌صورت یک روش روتین تشخیصی حداقل در مراکز دانشگاهی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات استاد بزرگوار جناب آقای دکتر فرخ قوام که در تنظیم این مقاله ما را یاری فرمودند ، نهایت تشکر را داریم .

References

1. Stemberg SS: Diagnostic surgical pathology. 3rd ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1990: 2319-2330.
2. Nicosia SV: Ovarian and peritoneal border-line neoplasms: Histopathology, diagnostic pitfalls and prognostication. Cancer Cont J, 1996, 3: 58-65.
3. Berek JS, Adashi E, Hillard PA: Novak's gynecology. 12th ed, Baltimore, Williams & Wilkins, 1996: 1155-1160.
4. Rosai J: Ackerman's surgical pathology. 8th ed, St Louis, Mosby, 1996: 1473-1482.
5. Kurman RJ: Blaustein's pathology of the female genital tract. 4th ed, New York, Springer-Verlag, 1994: 708-735.
6. Khattech A, Spatz A, Prade M, et al: Nucleolar organizer regions in ovarian tumors: discrimination between carcinoma and borderline tumor. Int J Gynecol Pathol, 1992, 11: 11-14.
7. Miller DA, Tantravahi R, Dev VG, O.J. Miller OJ: Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of nucleolus organizer region. Am J Hum Genet, 1977, 29: 480-502.
8. Derenzini M, Thiry M, Goessens G: Ultrastructural cytochemistry of mammalian cell nuceolus. J Histochem Cytochem, 1990, 38: 1237-1256.
9. Mc Gee JO, Isaacson PG, Wright NA: Oxford textbook of pathology. Oxford, Oxford university press, 1992: 586-90.
10. Dervan PA, Gilmartin LG, et al: Breast carcinoma kinetics: Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki 67 scores. Am J Clin Pathol, 1989, 92: 401-407.
11. Pich A, Chiusa L, Margaria E: Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. Cancer Detect Prev, 1995, 19: 282-291.
12. Hara A, Hirayman H, Sakai N, et al: Correlaion between nucleolar organizar region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. Surg neurol, 1990, 33: 320-4.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, et al: Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNOR analyses. Am J Clin Pathol, 1997, 107: 451-458.
14. Zergeroglu S, Aksakal O, Demirturk F, Gokmen O: Prognostic importance of nucleolar organizer region score in ovarian epithelial tumors. Gynecol Obstet Invest, 2001, 51: 60-63.
15. Mourad WA, Setrakian S, Hales ML, et al: The argyrophilic nucleolar organizer regions in ductal carcinoma insitu of the breast. Cancer, 1992, 69: 1739-44.
16. Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer region in lymphomas. J pathol, 1987, 151: 111-118.
17. Torabi-Nezhad S, Parvin Kheradmand P: Differentiation between prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia by AgNOR staining. MJIRI, 1999, 12: 333-338.
18. Silva Fonseca LM, Vieira doCarmo MA: AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. Braz Dent J, 2000, 11: 105-110.
19. Babu M, Mathur M, Gupta SD, Chattopadhyay TK: Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in esophageal cancer. Trop Gastroentrol, 1996, 17: 57-60.
20. Mauri FA, Barbareschi M, Scampini S, et al: Nucleolar organizer regions in mucinous tumors of the ovary. Histopathology, 1990, 16: 396-8.
21. Griffits AP, Pickles A, Wells M: AgNORs in diagnostic of serous and mucinous ovarian tumors. J Clin Pathol, 1989, 42: 1311. Letter.
22. Dong D: Morphometric determination of AgNORs in ovarian cancer cells. [Online]. 1997; Available from : URL : http://oak.cc.connecoll.edu/-ddon/biol.htm.

www.SID.ir