تحقیقی

ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR در افتراق لنفوم‌ها از ضایعات هایپرپلازی واکنشی عقده‌های لنفاوی

دکتر ژیلا ترابی‌زاده
استادیار گروه آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی ساری
دکتر فرشاد نقش‌وار
استادیار گروه آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی ساری
دکتر امید عمادیان
استادیار گروه آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی ساری

نویسنده مسؤول : دکتر ژیلا ترابی‌زاده
پست الکترونیکی : zhtorabi@yahoo.com
نشانی : ساری ، خیابان رازی ، بیمارستان امام خمینی بخش آسیب‌شناسی
تلفن : ۲۲۲۲۹۸۱
نمابر : ۲۲۲۲۹۸۱-۰۱۵۱

وصول مقاله : ۸۴/۳/۷
اصلاح نهایی : ۸۴/۹/۱۹
پذیرش مقاله : ۸۴/۱۰/۲

چکیده

زمینه و هدف : *روش‌های مختلفی شامل رنگ‌آمیزی H&E ، ایمونوهیستوشیمی، فلوسایتومتری، رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای افتراق ضایعات واکنشی در غدد لنفاوی از لنفوم وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR در افتراق لنفوم از ضایعات هایپرپلازی واکنشی عقده‌های لنفاوی انجام شد.*

روش بررسی : *تحقیق حاضر روی ۵۰ بلوک پارافینه شامل ۳۵ مورد لنفوما و ۱۵ مورد هیپرپلازی واکنشی در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان‌های امام خمینی و بوعلی سینا ساری انجام گرفت. یک‌صد سلول لنفوسیتی به صورت تصادفی شمارش گردید. نقاط سیاه واضح و مجزا از یکدیگر به عنوان یک نقطه واحد شمارش گردیدند. میانگین تعد د نقاط با استفاده از آزمون آماری تی استودنت ارائه گردید.*

یافته‌ها : *اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد نقاط Nor شمارش شده در دو گروه با برآورد P<۰/۰۵ وجود داشت. میانگین نقاط AgNOR در گروه هیپرپلازی واکنشی ۰/۴۷±۲/۲۷ و در لنفوما ۱/۷۲±۶/۷۱ بود. همچنین از نظر مورفولوژی نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای (AgNOR) در لنفوم‌ها بزرگ‌تر و نامنظم‌تر از هیپرپلازی واکنشی بودند.*

نتیجه‌گیری : *میزان نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای در افتراق ضایعات هیپرپلازی واکنشی غده‌های لنفاوی از لنفوم‌ها مفید می‌باشد. ضایعات واکنشی از بدخیمی‌ها تعداد نقاط مورد ارزیابی قرار گرفته است ، توصیه می‌گردد در زمینه پراکندگی و اندازه نقاط AgNOR که در درجه‌بندی لنفوم‌ها و طبقه‌بندی آنها کمک کننده است، مطالعات و بررسی‌های بیشتری انجام گیرد.*

کلید واژه‌ها : *نقاط سازمان دهنده هسته‌ای – هیپرپلازی واکنشی - لنفوما*

مقدمه

نظر به این که افتراق ضایعات واکنشی در غدد لنفاوی از لنفوم تنها با تکیه بر رنگ‌آمیزی H & E در برخی موارد مشکل بوده و همچنین این روش رنگ‌آمیزی براساس معیارهای کیفی می‌باشد ، امکان اشتباه وجود دارد. از طرفی مارکرهای پرولیفراسیون که از طریق ایمونوهیستوشیمی و فلوسیتومتری اندازه‌گیری می‌شوند ، مقرون به صرفه نمی‌باشد. لذا تلاش‌های محققین برای دستیابی به روش‌های نوین که آسان‌تر و ارزان‌تر و در هر آزمایشگاهی قابل انجام باشد، ادامه دارد. یکی از این روش‌ها استفاده از رنگ‌آمیزی به منظور شناخت نقاط سازمان دهنده هسته‌ای به عنوان معیار کمی و قابل اعتماد و بسیار مهم (با توجه به اندازه و درصد نقاط موجود در هسته) می‌باشد (۱و۲).

در سال‌های اخیر مارکرهای متعددی برای نشان دادن فعالیت هسته برای ارزیابی میزان پرولیفراسیون سلول معرفی شده‌اند که شامل P53 ، پلوئیدی و محتوی DNA ، AgNOR (Ag Nucleolar organizer region) Ki67 و PONA (آنتی هسته‌ای سلول در حال پرولیفراسیون) هستند. از این میان AgNOR روش ساده ارزان و دارای صحت بیش از بسیاری روش‌های دیگر است (۱و۲).

AgNOR مناطقی از کروماتین می‌باشند که هستک ناپدید شده در جریان میتوز سلولی ، در انتهای مرحله تلوفاز در اطراف آن تشکیل می‌شود (۳).

در انسان NORS روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های آکروسنتریک [۱۳،۱۴،۱۵،۲۱،۲۲] قرار دارند (۴).

توسط روش هیبریداسیون درجا نشان داده شده است که NORS حاوی ژن‌هایی هستند که RNA ریبوزومی را کد می‌کنند (۳و۴).

از آنجا که RNA واسطه اصلی سنتز پروتئین است، پیشنهاد شده که تعداد ویژگی‌های NORS ممکن است منعکس کننده فعالیت هسته‌ای و سلولی باشد (۵-۳).

رنگ‌پذیری NOR با نقره ، اسیدفرمیک یا آمونیاک می‌باشد (۴و۵) که رنگ‌پذیری آن با نقره به خاطر وجود پروتئین‌های اسیدی نقره‌دوست می‌باشد. دو پروتئین اصلی NORS در ۱۰۰ سلول منعکس کننده DNA ploidy است (MAgnor) و باور بر این است که درصد سلول‌هایی که تعداد نقاط بیش از این تعداد معین را نشان می‌دهند، منعکس کننده فعالیت پرولیفراتیو سلولی هستند (PAgNOR) و به عقیده برخی مؤلفین مطالعه AgNOR ارزشی تشخیصی و پروگنوستیک بیشتری نسبت به فلوسیتومتری در آسیب‌شناسی تومورها دارد (۶).

Archive of SID

www.SID.ir

روش بررسی

این تحقیق روی ۵۰ بلوک پارافینی از غدد لنفاوی سرویکال موجود در بخش آسیب‌شناسی بیمارستان امام خمینی و بوعلی سینای شهرستان ساری طی سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۸۰ انجام گرفت.

نمونه‌ها شامل دو گروه متشکل از ۱۵ نمونه ضایعات واکنشی و ۳۵ نمونه ضایعات لنفومی بود. از هر بلوک برشی به ضخامت چهار میکرون تهیه و به روشH8E و AgNOR رنگ شدند. سپس توسط سه آسیب‌شناس به‌طور جداگانه در هر مورد از نظر NORs آن در هسته سلول شمارش و ارزیابی گردید و نتایج در پرسشنامه مصوب برای هر نمونه ثبت شد.

مواد اولیه برای روش رنگ آمیزی AgNOR

نیترات نقره، پودر ژلاتین، اسید فرمیک، آب مقطر سه بار تقطیر شده، اتانول.

روش رنگ‌آمیزی

۱- برش‌های بافتی به ضخامت ۴-۳ میکرون از بلوک‌های پارافینی تهیه شدند.

۲- لام‌ها درگزیلول دپارافینه شدند.

۳- توسط الکل‌های ۹۵درصد و ۹۰درصد و ۷۰درصد آب‌گیری و با آب مقطر شسته شدند.

۴- محلول رنگ‌آمیزی AgNOR تازه تهیه شده روی لام‌ها ریخته شد.

۵- لام‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و محفظه کاملاً تاریک آنکوبه شدند.

۶- با آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شدند.

۷- به ترتیب در الکل ۷۰درصد و ۹۶درصد و مطلق هر یک به مدت دو دقیقه آبگیری شده و سپس در هوا خشک شدند.

محلول نیترات نقره با مخلوط کردن یک قسمت از محلول شدن (۱) با دو قسمت از محلول شدن (۲) به دست می آید.

محلول شدن یک : ۲ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی لیتر اسید فرمیک ۱درصد

محلول شدن دو : نیترات نقره ۵۰درصد در آب مقطر

توجه : تمام ظروفی که به‌کار برده می‌شود باید کاملاً تمیز بوده و پس از شستشو با اسید، با آب مقطر ۳ بار تقطیر شده آبکشی شود.

پس از رنگ‌آمیزی نواحی NOR به صورت نقاط سیاه مشخص داخل هسته‌ای نمایان می‌شوند و هسته‌ها رنگ قهوه‌ای روشن به خود می‌گیرند.

اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمائی ۱۰۰۰× مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر نمونه ۱۰۰ سلول لنفوئیدی به طور تصادفی در چند میدان میکروسکوپی انتخاب شده و از نظر معیارهای زیر مورد توجه قرار گرفتند:

الف) تعداد متوسط نقاط رنگ‌گرفته با نقره در هسته

ب) مورفولوژی و اندازه نقاط رنگ گرفته با نقره

مهم‌ترین اشکال رنگ‌آمیزی رسوب رنگ در زمینه اسلاید می‌باشد که ممکن است با نقاط AgNOR اشتباه شود. برای جلوگیری از آن باید محلول رنگ‌آمیزی را ۳ بار از صافی عبور داد. میانگین و انحراف معیار معیارهای مورد نظر ثبت و برای مقایسه آماری از آزمون تی با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (α=۰/۰۵) استفاده شد.

یافته‌ها

تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در ضایعات هیپرپلازی واکنشی غدد لنفاوی با انحراف معیار ۰/۴۷±۲/۲۷ و دامنهٔ تغییرات ۵/۳-۳/۵ و در لنفوم‌ها با انحراف معیار ۱/۷۲±۶/۷۱ و دامنهٔ تغییرات ۵/۰۷-۳/۷ به دست آمد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

بحث

نتایج نشان دادند که میزان NORs در هیپرپلازی واکنشی و لنفوم عقده‌های لنفاوی با یکدیگر اختلاف دارند. تغییرات کمی و کیفی در نقاط سازمان دهنده هسته‌ای می‌تواند بیانگر میزان فعالیت هسته سلول‌ها در موارد واکنشی یا نئوپلاستیک باشد.

NORs مناطقی از کروماتین هستند که هستک در اطراف هستک آنها تشکیل می‌گردد و حاوی ژن‌های کدکننده RNA ریبوزومی می‌باشند (۵). تعداد AgNOR با سرعت رشد تومور مرتبط است (۵). در سال‌های اخیر مطالعه روی نواحی سازمان‌دهنده هسته‌ای در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نتایج بسیار خوبی در مورد تشخیص ، درجه‌بندی و در نهایت پیش‌آگهی ضایعات خوش‌خیم و بدخیم مختلف نشان داده است.

پلوتون و همکارانش برای اولین بار روش AgNOR را برای بلوک‌های پارافینی فیکس شده در فرمالین ابداع کردند (۷-۴) و سپس کروکر AgNOR را برای بلوک‌های پارافینی فیکس شده در فرمالین ابداع کرد (۷-۴) و کاربرد این روش را در تشخیص آسیب‌شناسی تومورها گزارش نمود (۴).

در سال ۱۹۹۴ Derizini گزارش کرد که افزایش تعداد کروموزم‌های آکروسنتریک حامل NOR با افزایش تعداد کلی کروموزم‌ها مرتبط است و مقادیر بالای NOR اینترفاز موید هیپردیپلوئیدی که شایع‌ترین تغییر کروموزومی سلول‌های بدخیم است ، می باشد. این تئوری با انجام مطالعه روی سرطان پستان به این شکل اثبات گردید که هر چه تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

AgNors در تومورهای اولیه بیشتر باشد و از نظر مورفولوژی نامنظم‌تر و بدشکل‌تر باشد ، متاستاز به گره‌های لنفاوی گسترده‌تر و پیش‌آگهی بدتر می‌شود (۸و۹). این روش برای تمایز آدنوم فولیکولر تیروئید از کارسینوم فولیکولر (۱۰و۱۱) تمایز سیروز از هپاتوسلولر کارسینوما (۱۲) تمایز ضایعات خوش‌خیم از بدخیم در مخاط دهان (۱۳) و مثانه (۱۴) و تمایز هیپرپلازی آندومتر از نئوپلاسم آن (۴) و BPH از کارسینوم پروستات (۱۵و۱۶) به‌کار رفته است. علاوه بر ارزش تشخیصی و پروگنوستیک AgNors در کارسینوم کولورکتال نیز تاکید شده است (۱۷و۱۸). همچنین AgNOR در افتراق بین آملوبلاستومای Conventional و unicystic از کیست دنتی‌جروس و ادنتوژنیک کراتوسیست (۱۹) و در افتراق آملوبلاستوما از بازال‌سل کارسینوما کاربرد دارد (۲۰). همچنین هیچ‌گونه هم‌پوشانی بین انفیلترای لنفوسیتی و کارسینوم Oat cell انفیلتره در نمونه‌های برونش (۴) و بین سلول‌های بدخیم (متاستاتیک و مزوتلیوما) و سلول‌های مزوتلیال راکتیو در مایع پلور مشاهده نشده است (۲۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۵ در کشور چین به وسیله Gan-x صورت گرفت ، استفاده از روش AgNors در افتراق ضایعات Non-Hodgkins lymphoma از Reactive hyperplasia بود که نتایج به دست آمده تفاوتی را در نقاط AgNOR در ضایعات واکنشی Low grade Lymphoma (P<۰/۰۵) نشان داده و همچنین تفاوت مشخصی در تعداد نقاط AgNOR در بین گروه‌های NHL (P<۰/۰۵) وجود داشت و نتیجه گرفتند که با استفاده از رنگ‌آمیزی جدید، AgNORS برای افتراق لنفوم‌ها از ضایعات واکنشی و در درجه‌بندی لنفوم‌ها و طبقه‌بندی آنها کمک کننده است (۲۲).

مطالعه دیگر در سال ۱۹۹۳ در کشور ترکیه که توسط yekeler و همکاران صورت گرفته است ، تعداد نقاط AgNORS برای لنفوسیت‌های طبیعی ۱/۱۹ با SD=۰/۰۹، برای reactive lymph nodes ۳/۰۴ با SD=۰/۱۴ ، برای Low grade lymphoma ۴/۷۹ با SD=۰/۴۴ ، برای intermediate grade lymphoma ۶/۳۳ با SD=۱/۵۸ و برای High-grade lymphoma ۱۰/۵۳ با SD=۱/۹۷ که تفاوت معنی‌داری در نقاط AgNOR در مابین گروه‌ها P<۰/۰۵ وجود دارد و پیشنهاد می‌کند که این روش به منظور تشخیص و grading لنفوم‌ها به کار رود (۲۲). در مطالعه Crocker در سال ۱۹۸۷ تعداد نقاط AgNORS در لنفوم‌های Low grade از ۱ تا ۱/۵ و در لنفوم‌های High grade تعدادشان از ۶/۸ تا ۴/۴ در هر هسته متغیر بوده است (۲۳).

بالاخره بر ارزش تشخیصی و پروگنوستیک AgNOR در کارسینوم کولورکتال نیز تاکید شده است. همچنین از نظر مورفولوژی AgNOR در لنفوم‌ها بزرگ‌تر و نامنظم‌تر از هیپرپلازی واکنشی بودند که مشابه توصیف مورفولوژیکی AgNors در مطالعه Yekeler بود (۲۲) و اما برخلاف مطالعه Crocker تعداد نقاط AgNOR در Low grade lymphoma ۱/۵ و در High grade lymphoma ۴/۴ بوده است (۲۳). تعداد NORs با محتوی DNA و سرعت رشد سلولی در ارتباط است و ممکن است مارکر بالقوه پرولیفراسیون سلولی و احتمالاً مارکری برای دیفرانسیاسیون سلولی باشد.

مطالعه ضایعات پروستات (۱۵و۲۸) تیروئید (۲۱و۲۲) پستان (۹و۲۰) ، مثانه (۱۴) و دیگر تومورها این موضوع را تاکید کردند.

نتیجه‌گیری

میانگین تعداد نقاط NOR در هسته لنفوسیت‌های reactive ۲/۲۷±۰/۴۷ و در لنفوم‌ها ۶/۷۱±۱/۷۲ بوده است که اختلاف معنی‌داری در دو گروه Reactive و لنفوم‌ها از نظر آماری بین میانگین دوگروه وجود داشت.

اگرچه در این تحقیق میزان نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در افتراق لنفادنوپاتی‌های واکنشی از لنفوم‌ها مفید نشان داده شده است ، اما با توجه به اختلاف در تعداد نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در ضایعات یکسان و همچنین پراکندگی و اندازه آنها که در درجه‌بندی لنفوم‌ها و طبقه‌بندی آنها استفاده می‌گردد، وجود دارد. توصیه می‌شود مطالعات بیشتری در این زمینه با روش‌های یکسان و استانداردهای مشخص و روش شمارش این نقاط صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی و بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و همکاران بخش آسیب‌شناسی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1) Olson MOJ. *The role of proteins in nucleolar structure and function. In: The Eukaryotic Nucleus: Molecular Biochem- istry and Macromolecular Assemblies (Straus PR and Wilson SH, eds)* The Telford Press Inc, Caldwell MJ, 1990; 2: 519-559.

2) Roussel P, Belenguer P, Amalric F, Hernandez-Verdun D. *Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state*. Exp Cell Res. 1992; 203(1):259-69.

3) Derenzini M, Sirri V, Trere D. *Nucleolar organizer region in tumor cell*. Cancer. 1994; 7(2): 1-10.

4) Lohr CV, Driemeier D, Teifke JP. *Polyethylene glycol-thiosulfate (PEG-Th) staining--a modification of the AgNOR method*. Zentralbl Pathol. 1995; 140(6):465-8.

5) Miller OJ, Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Croce CM.

Archive of SID
www.SID.ir

Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73(12):4531-5.

6) Pich A, Chiusa L, Margaria E. *Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology*. Micron. 2000; 31(2):133-41.

7) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. *Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level.* Histochem J. 1986; 18(1):5-14.

8) Smith R, Crocker J. *Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy*. Histopathology. 1988; 12(2):113-25.

9) Mourad WA, Setrakian S, Hales ML, Abdulla M, Trucco G. *The argyrophilic nucleolar organizer regions in ductal carcinoma in situ of the breast. The significance of ploidy and proliferative activity analysis using this silver staining technique*. Cancer. 1994; 74(6):1739-45.

10) Kawasaki F, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Ikeda K, Sugano S, et al. *Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence*. Oncol Rep. 2000; 7(4):853-7.

11) Ruschoff J, Prasser C, Cortez T, Hohne HM, Hohenberger W, Hofstadter F. *Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features*. Am J Surg Pathol. 1993; 17(12):1281-8.

12) Jain R, Malhotra V, Kumar N, Sarin SK. *Nucleolar organizer regions in cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Trop Gastroenterol. 1998; 19(3):100-1.

13) Xie X, Clausen OP, Sudbo J, Boysen M. *Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Cancer. 1997 Jun 1;79(11):2200-8.

14) Jinza S, Iki M, Noguchi S, Shuin T, Kubota Y, Takano Y, et al. *AgNOR staining of cell imprint preparations of human bladder cancer*. Acta Cytol. 1996; 40(6):1159-64.

15) Mamaeva S, Lundgren R, Elfving P, Limon J, Mandahl N, Mamaev N, et al. *AgNOR staining in benign hyperplasia and carcinoma of the prostate*. Prostate. 1991; 18(2):155-62.

16) Ahiskali R, Alican Y, Ekicioglu G, Cevik I, Kullu S, Akdas A. *Evaluation of three different AgNOR counting methods in advanced carcinoma of the prostate*. Prostate. 1995; 26(2):105-10.

17) Eminovic-Behrem S, Trobonjaca Z, Petrovecki M, Dobi-Babic R, Dujmovic M, Jonjic N. *Prognostic significance of DNA ploidy pattern and nucleolar organizer regions (AgNOR) in colorectal carcinoma*. Croat Med J. 2000; 41(2):154-8.

18) Sugai T, Nakamura SI, Habano W, Uesugi N, Sato H, Yoshida T, et al. *Usefulness of proliferative activity, DNA ploidy pattern and p53 products as diagnostic adjuncts in colorectal adenomas and intramucosal carcinomas*. Pathol Int. 1999; 49(7):617-25.

۱۹) اسلامی ، ب. فیروزی ، م. مشرف ، م. ولایی ، ن. *بررسی میزان نقاط سازمان دهنده هسته‌ای در ضایعات منتخب ادنوپنیک*. فصلنامه پژوهشی پژوهنده. سال ۱۳۸۱. دوره ۷. شماره ۲۹. صفحات ۲۲۷ تا ۲۳۱.

20) Rosa LE, Jaeger MM, Jaeger RG. *Morphometric study of nucleolar organiser regions in ameloblastoma and basal cell carcinoma*. Oral Oncol. 1997; 33(3):209-14.

21) Ayres JG, Crocker JG, Skilbeck NQ. *Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organiser region associated proteins*. Thorax. 1988; 43(5):366-70.

22) Yekeler H, Ozercan MR, Yumbul AZ, Agan M, Ozercan IH. *Nucleolar organizer regions in lymphomas: a quantitative study*. Pathologica. 1993; 85(1097):353-60.

23) Crocker J, Nar P. *Nucleolar organizer regions in lymphomas*. J Pathol. 1987 Feb;151(2):111-8.

24) Smith R, Crocker J. *Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy*. Histopathology. 1988; 12(2):113-25.

Archive of SID

www.SID.ir