

ارزش تشخیصی گرانولهای مناطق سازمان دهنده هستک بر اساس شمارش و الگوی SAPA در بیماریهای پوست

دکتر علیرضا منصف^۱، *دکتر سید محمد حسینی پناه^۲، دکتر مزگان ابراهیمی^۱، دکتر حسین محجوب^۳، دکتر فاطمه اقبالیان^۴

چکیده

سابقه و هدف: از آنجائیکه ارزش تشخیص گرانولهای مناطق سازمان دهنده هستک (Ag-NOR: Argiophilic Nucleolar Organizer Region) بر اساس شمارش و الگوی Subjective Assessment Pattern Ag-NOR (SAPA) در بیماریهای پوست اهمیت فراوانی دارد، بهمین منظور این مطالعه با هدف شمارش تعداد گرانولهای Ag-NOR و بررسی الگوی ذهنی بر اساس تقسیم SAPA در سرطان سلولهای سنگفرشی (SCC: Squamous Cell Carcinoma)، کراتوز خورشیدی (SK: Solar Keratosis)، سرطان سلولهای بازال (BCC: Basal Cell Carcinoma) و مقایسه آن با پوست سالم انجام گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه توصیفی تحلیلی تعداد ۶۹ مورد، شامل ۱۸ مورد SCC، ۱۸ مورد SK، ۱۸ مورد BCC و ۱۶ مورد پوست سالم مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه‌ها توسط روش Ag-NOR رنگ آمیزی شده و توسط آسیب شناس شمارش گرانولهای Ag-NoR و SAPA صورت گرفت و با استفاده از روشهای آماری غیرپارامتری در نرم افزار SPSS نسخه ۱۰/۵ داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P\text{-value} < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین شمارش گرانولهای Ag-NoR در SCC برابر ۲/۹۲، در SK برابر ۲/۲۹، در BCC برابر ۱/۵۹ نسبت به پوست سالم که ۰/۹۳ بوده است ($p\text{-value} < 0/001$). میانگین بر اساس SAPA score برای SCC، SK، BCC و پوست نرمال به ترتیب ۷/۹۴، ۷/۶۱، ۶/۳۵، ۵ بوده است. ($p\text{-value} < 0/001$).

نتیجه گیری: بر اساس این مطالعه ارزش تشخیص گرانولهای Ag-NOR بر اساس شمارش و الگوی SAPA در بیماریهای پوست ارزشمند و کارآمد می‌باشد.

کلمات کلیدی: پوست، سرطان سلولهای سنگفرشی، سرطان سلولهای بازال، کراتوز خورشیدی، مناطق سازمان دهنده هستک نقره دوست

مقدمه

هستک (Ag-NOR) دیده می‌شوند. تعداد NOR نشان دهنده فعالیت هسته و سلول است (۱ و ۲).

ارزیابی پروتئینهای وابسته به مناطق سازمان دهنده هستک (NOR) با اتصال به نقره، روشی است که دارای مزایایی از قبیل سادگی انجام و سرعت مناسب مرحله می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد

مناطق سازمان دهنده هستک (NOR: Nucleolar Organizer Regions) نواحی از DNA در هسته سلول می‌باشد که با رنگ آمیزی نقره در بررسی توسط میکروسکوپ نوری بصورت مجموعه‌ای از پروتئینهای غیر هیستونی نقره دوست در ناحیه سازمان دهنده

۱- دانشیار گروه پاتولوژی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی همدان..

۲- استادیار گروه آناتومی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی همدان (*نویسنده مسئول).

تلفن: ۸-۸۲۷۶۲۹۵ - ۰۸۱۱ فاکس: ۸۲۷۶۲۹۹ - ۰۸۱۱ e-mail: hosseinipناه@hotmail.com

۳- دانشیار گروه آمار حیاتی - دانشکده بهداشت - دانشگاه علوم پزشکی همدان.

۴- دانشیار گروه اطفال - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی همدان.

خوش خیم به عنوان پوست سالم استفاده شده است که در مطالعه Shimizu نیز چنین عمل شده است (۱۰). از هر بلوک دو برش به ضخامت ۴ میکرون تهیه شده است که یکی برای روش رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) و دیگری با روش اختصاصی Ag-NOR رنگ آمیزی شده‌اند.

روش رنگ آمیزی Ag-NOR

برای هر نمونه برشهای ۴ میکرونی روی لام شیشه‌ای قرار داده شده سپس دوبار در دو ظرف حاوی گریل، هر کدام به مدت ۲ دقیقه پارافین زدائی شدند. نمونه‌ها مراحل آب دهی (Rehydration) از درجات مختلف الکل تا آب مقطر را طی کردند. به مدت ۵ دقیقه در اسید نیتریک ۷٪ قرار داده شدند. از حل کردن ۲g/dl ژلاتین در ۱ml/dl فرمیک اسید آبی که به نسبت — با محلول نترات نقره ۵۰g/dl مخلوط شد، یک محلول کار تهیه گردید که از این محلول کار روی اسلایدها پوشانده شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در محل تاریک قرار داده شدند. سپس اسلایدها را توسط آب مقطر شستشو داده و پس از طی مراحل آب گیری توسط الکل با درجات مختلف روی اسلایدها لامل چسبانده و آماده بررسی شدند. اسلایدهای رنگ آمیزی شده به روش Ag-NOR با میکروسکوپ Olympus BH_۴ و لنز روغنی (با بزرگنمایی ۱۰۰) توسط دو نفر آسیت شناس به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی لامها بصورت تصادفی و کور صورت گرفته و آسیب شناس از تشخیص لام اطلاع نداشت.

ذرات Ag-NOR بصورت ذرات قهوه‌ای یا سیاه در زمینه زرد رنگ هسته قابل مشاهده است. در هر نمونه تعداد این ذرات در ۱۰۰ عدد سلول شمارش گردید و سپس متوسطی برای هر سلول در هر نمونه بدست آمد. علاوه بر شمارش ذرات در هسته سلول، بر اساس تفاوت در اندازه و شکل ذرات اطراف هسته (satellite) و تفاوت اندازه و شکل تجمعی ذرات (cluster) که هر کدام بین ۱ تا ۳ رتبه‌بندی می‌شود و همچنین تعداد متوسط ذرات در هر سلول که بصورت اندک، معادل ۱، متعدد، معادل ۲ و بسیار، معادل ۳، score بندی می‌شود (جدول ۱). با استفاده از این سیستم، score داده شده به هر نمونه بین حداقل ۵ و حداکثر ۱۵ می‌باشد.

جهت بررسی وجود تفاوت در رتبه و تعداد گرانول بین دو گروه بیمار و سالم، از آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney استفاده شده

که کمیت Ag-NOR در تمایز فعالیت خوش خیم از بدخیم و موارد پیش بدخیمی و همچنین از جهت پیش آگهی بیماری ارزش پیش گوئی کننده دارد.

از روش Ag-NOR در مطالعات بسیاری از جمله تومورهای پوست و سایر نواحی استفاده شده است. در یک مطالعه ارتباط بین مرحله (Stage) بر اساس سیستم Clark در ملانوم بدخیم، با تعداد دانه‌های NOR مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص گردید که هر چه درجه تمایز بدتر (high grade) و مرحله clark پیشرفته‌تر باشد، تعداد گرانولهای Ag-NOR بیشتر است. در یک مطالعه دیگر کمیت Ag-NOR در میکرومتر مربع هسته در ضایعات سرطان سلولهای سنگفرشی (SK: Solar خورشیدی، SCC: Squamous Cell Carcinoma) و (Keratosi)، سرطان سلولهای بازال (BCC: Basal Cell Carcinoma) و پوست نرمال مقایسه شده است (۳).

در برخی از مطالعات از سیستم‌های آنالیز تصویری جهت شمارش بهره برده شده تا شمارش عینی (objective) باشد و اثر مشاهده گر حذف شود. در این پژوهش با استفاده از رنگ آمیزی Ag-NOR، تعداد گرانولهای NOR در موارد پوست سالم AK، SCC و BCC مورد بررسی قرار داده و بر اساس روش استاندارد ارائه شده توسط کمیته اروپائی، به بررسی کمیت Ag-NOR در موارد ذکر شده پرداختیم (۴ و ۵).

از روش رنگ آمیزی Ag-NOR در بررسی پیش آگهی (prognosis) بدخیمی‌ها در بسیاری از تومورها از جمله بدخیمی‌های پستان (۶)، معده (۷)، کولون (۸)، اندومتر (۹) استفاده شده است.

علاوه بر استفاده از روش شمارش گرانولها، در این مطالعه از سیستم ارزیابی الگوی Ag-NOR بصورت ذهنی SAPA در تمایز بین ضایعات خوش خیم و بدخیم پوست استفاده شده است.

مواد و روشها

این مطالعه از نوع گذشته نگر بوده است که با بررسی آرشیو نمونه‌های پاتولوژی موجود در بیمارستان آموزش درمانی سینا در همدان از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۴، بلوک‌های پارافینی از نمونه‌های تکه داری شده پوست مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی ۶۹ مورد بوده است که شامل ۱۸ مورد SCC و ۱۸ مورد SK و ۱۷ مورد BCC و ۱۶ مورد نمونه پوست سالم می‌باشد. لازم به ذکر است که از نواحی غیر درگیر سایر ضایعات پوستی

جدول ۱- الگوی رتبه بندی SAPA

Subjective	Ag-NOR	Pattern	Assessment
Parameter			Score
Estimated number percell			
Few (<5)			۱
Several (5-10)			۲
Many (>10)			۳
Variation Satellite size and shape			
Uniform			۱
Moderate variation			۲
Marked variation			۳
Variation in Cluster size and shape			
Uniform			۱
Moderate variation			۲
Marked variation			۳

جدول ۲- مقایسه گرانول در گروه‌های مختلف

گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	P-value
S.C.C	۱۸	۲/۹۲	۰/۶۵	۰/۰۰۱
S.K	۱۸	۲/۲۹	۰/۱۹	
B.C.C	۱۷	۱/۵۹	۰/۲۱	
NI	۱۶	۰/۹۳	۰/۱۹	

با انجام آزمون Mann-Whitney مشخص گردید که میانگین گرانول در دو گروه سالم و بیمار یکسان نمی‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه تعداد گرانول در گروه بیمار و سالم

گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	P-value
نرمال	۱۶	۰/۹۳	۰/۱۹	۰/۰۰۱
بیمار	۵۳	۲/۲۸	۰/۶۸	

با انجام ضریب همبستگی اسپرمن Spearman's مشخص گردید ضریب همبستگی بین گرانول و satellite برابر با $rs = 0/638$ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی دار است ($p < 0/05$).

همانطوریکه در جدول شماره ۴ مقایسه رتبه بین گروه‌های مختلف آورده شده است. با انجام آزمون Kruskal-Wallis نتیجه گرفته می‌شود که میانگین رتبه بین گروه‌های مختلف متفاوت است ($p < 0/001$).

جدول ۴- مقایسه score بین گروه‌های مختلف

گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	P-value
S.C.C	۱۸	۷/۹۴	۰/۸۰	۰/۰۰۱
S.K	۱۸	۷/۶۱	۰/۷۷	
B.C.C	۱۷	۶/۳۵	۱/۴۵	
Normal	۱۶	۵/۰۰	۰/۰۰	

مقایسه میانگین رتبه بین گروه نرمال و بیمار آورده شده است که با انجام آزمون Mann-Whitney وجود تفاوت معنی دار بین این دو گروه مشخص می‌شود ($p < 0/001$).

جدول ۵- مقایسه score بین گروه بیمار سالم

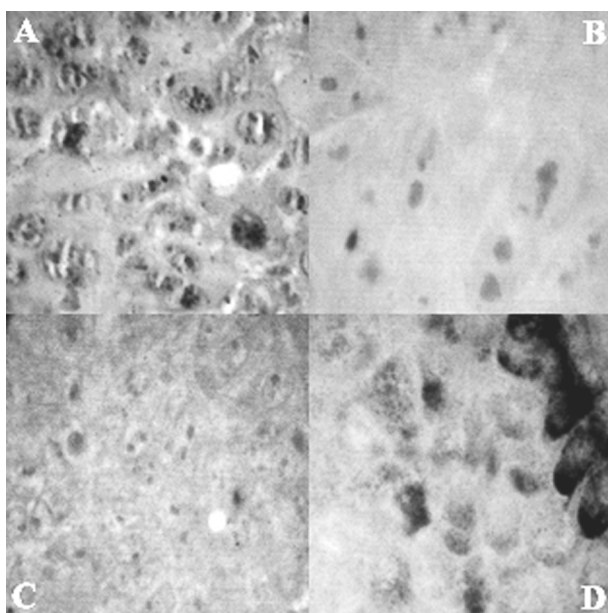
گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	P-value
نرمال	۱۶	۰/۰۵	۰۰/۰	۰/۰۰۱
بیمار	۵۳	۳۲/۷	۲۳/۱	

و جهت بررسی رتبه و تعداد گرانول بین گروه‌های مختلف SCC, BCC, SK و پوست طبیعی از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شده است. همچنین جهت بررسی ضریب همبستگی بین تعداد گرانول و ذرات اطراف هسته از ضریب همبستگی اسپرمن استفاده شده است. ملاک معنی دار بودن آماری $p\text{-value} < 0/05$ بوده است. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۰/۵ صورت گرفته است.

یافته‌ها

در این بررسی ۶۹ مورد بیوسپی پوست مورد مطالعه قرار گرفت که شامل ۱۶ مورد پوست نرمال، ۱۷ مورد BCC، ۱۸ مورد SK، ۱۸ مورد SCC می‌باشد. میانگین تعداد گرانولهای Ag-NOR در این چهار گروه به شرح زیر است:

برای SCC میانگین تعداد گرانول در هسته ۲/۹۲، برای SK میانگین تعداد گرانول در هسته ۲/۲۹ و برای BCC میانگین تعداد گرانول در هسته ۱/۵۹ و برای پوست نرمال میانگین تعداد گرانول در هسته ۰/۹۳ می‌باشد. با مقایسه تعداد گرانولها در هر گروه با تعداد آنها در پوست سالم و انجام آزمون Kruskal-Wallis نتیجه گرفته می‌شود که میانگین تعداد گرانول در چهار گروه دارای تفاوت معنی دار آماری است ($p\text{-value} = 0/001$) (جدول ۲).



شکل ۱- نمای میکروسکوپی بافت (A) SCC، (B) BCC، (C) SK و پوست طبیعی (D) با روش Ag-NOR (×۱۰۰۰).

همچنین با توجه به cutoff ۱/۷ تمایز بین تومورهای با درجه بدخیمی پایین تر مثل BCC در مقایسه با SCC که درجه بدخیمی بالاتری دارد نیز امکان پذیر است (۱/۵۹ برای BCC در مقابل ۲/۹۲ برای SCC). بنابراین با استفاده از cutoff مربوط به شمارش گرانول می توان تمایز ضایعات خوش خیم از بدخیم استفاده نمود که این روش نسبتاً آسانتر و سریعتر می باشد. همچنین می توان از سیستم رتبه بندی SAPA استفاده نمود که روش دقیق تری است و چند شاخص پارامتر را در نظر می گیرد و لیکن مستلزم مقداری صرف وقت می باشد.

References

- 1- Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzini P, Marinozzi V. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32:149-92.
- 2- Ploton D, Menager M, Jeanneson P. Improvement of staining and in visualization of the argyrophilic protein of the nucleolar organizer region at the

بحث و نتیجه گیری

Dervan و همکاران (۱۱) مشخص کردند که تعداد گرانول Ag-NOR با فعالیت پرولیفراتیو، درجه پلوئیدی و وضعیت مشخص شدن هستک افزایش می یابد (۱۱).

در مطالعه کوماروکانا و همکاران (۵) مشخص گردید که شمارش و score گرانولهای Ag-NOR با افزایش مرحله بیماری در ملانوم افزایش می یابد. در همین مطالعه میانگین شمارش Ag-NOR در SCC برابر ۵/۷۳ و میانگین رتبه Ag-NOR معادل ۱۰/۸۲ می باشد. برای BCC این اعداد برای میانگین شمارش و رتبه به ترتیب ۴/۱۴ و ۱۰/۳۳ گزارش گردیده است (۵).

میزان cutoff برای شمارش گرانول ۳ و برای رتبه ۹ گزارش شده است (۵). به علت تفاوت در شمارش گرانولهای در مطالعات مختلف، هر آزمایشگاه بایستی برای تشخیص صحیح توسط تکنیک Ag-NOR یک cutoff برای خود مشخص نماید.

میزان cutoff بدست آمده جهت شمارش گرانولها بین دو گروه سالم و بیمار معادل ۱/۲۵ با حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۳/۷٪ می باشد. این cutoff برای تمایز بین SCC و گروه پوست نرمال معادل ۱/۸ با حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ بوده است. همچنین cutoff تمایز بین SK و پوست نرمال ۱/۷ و تمایز بین BCC و پوست نرمال ۱/۲۵ می باشد که دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ است.

با توجه به ملاحظات آماری و تعداد نسبتاً قابل توجه موارد مورد بررسی، تمایز بین موارد خوش خیم از بدخیم با توجه به شمارش گرانولهای Ag-NOR معنی دار و کاربردی است (۰/۹۳ در مقابل ۲/۲۸ و با $p\text{-value} < 0/001$) (شکل ۱).

optical level. *Histochem J* 1986; 18:5-14.

3- Tuccario G, Giuffre G, Catalano A. Standardized Ag-NOR Analysis in Actinic keratosis. *Am J Dermatopathol* 2001; 23 (5): 407-412.

4- Offner D, Aubele M, Biesterfeld S, Knuchel R. Guidelines of Ag-NOR quantification- first update. *Virchows Arch* 1995; 427:341-349.

- 5- Kumar Khana A, Kumar Giri A, Khanna A, Kumar M. Nucleolar organizer region count and Subjective Ag-NOR Pattern Assessment (SAPA) score in skin tumors. *J Surg Oncol* 2001; 78:273-278.
- 6- Shane M, Meehan MB, Hilary Magee F, Oesmond N, Dervan A. The Diagnostic value of silver nucleolar organizer region assessment in breast cytology. *Ana Pathol* 1994; 101(96): 689-93.
- 7- Giuffre G, Caruso RA, Barresi G. Prognostic significance of standardized Ag-NOR analysis in early and advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 1998; 433:261-6.
- 8- Ofner D, Riedmann B, Maier H, Ruschoff J. Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in radically resected colorectal adenocarcinoma, correlation with tumor stage and long term survival. *J Pathol* 1995; 175:441-8.
- 9- Giuffre G, Fulcheri E, Gualco M. Standardized Ag-NOR analysis as a prognostic parameter in eudiometrial carcinoma, endometrioid type. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23:31-9.
- 10- Shmizu T, Oga A, Murakami T. Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity and histological degree of malignancy in solar keratosis. *Dermatol* 1999; 199:113-8.
- 11- Dervan P, Gilmartin L, Loftus B, Carney D. Breast carcinoma kinetics: Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlation with Ki-67 scores. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:401-407.

Archive of SID

The Diagnostic Value of Ag-NOR analysis and SAPA score in Normal and skin lesions

Monsef AR ; MD¹, *Hosseinipناه SM ;PhD², Ebrahimi M;MD¹, Mahjub H; PhD³, Eghbalian F; MD⁴

Abstract

Background: Evaluation of the diagnostic value of silver nucleolar organizer Region assessment in skin diseases is important. According to this reason, we want to study the Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (Ag-NOR) count and Subjective Ag-NOR Pattern Assessment (SAPA) score in normal skin, Squamous Cell Carcinoma (SCC), Basal Cell Carcinoma (BCC) and Solar Keratosis (SK).

Materials and Methods: The study groups consisted of 69 cases (18 SCC, 18 SK, 17 BCC and 16 Normal skin). The specimens were studied by microscope which were prepared by H&E staining and silver staining for Ag-NOR.

Results: The mean count in SCC was 2.92, in SK 2.29 and in BCC 1.59, which was statistically significant compared to 0.93 in normal skin (p value <0.001). The SAPA score was in SCC 7.94 in SK 7.61 in BCC 6.35 and in normal skin 5.00 (p value <0.001).

Conclusions: Ag-NOR count and SAPA score in normal and pathological status of skin has positive results.

Keywords: Ag-NOR, BCC, SCC, SK, Skin.

1- Associated Professor, Hamedan University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pathology

2- (*Corresponding Author) Assistant Professor, Hamedan University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Anatomy

3- Associated Professor, Hamedan University of Medical Sciences, Faculty of Health, Department of Biostatistics

1- Associated Professor, Hamedan University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pediatric