SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)

ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی AgNOR در افتراق سلولهای خوشخیم و بدخیم مایعات سروزی

*دکتر عباسعلی امیدی، دکتر نوریه شریفی، دکتر محمود رضا کلانتری، دکتر علیرضا قنادان

*گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

این مطالعه برای ارزیابی تکنیک رنگ‌آمیزی AgNOR (Argyrophilic organizer region protein) در افتراق سلولهای مزوتلیال تحریکی از سلولهای بدخیم در افیوژنهای سروز انجام شده است. نقاط AgNOR در ۶۶ نمونه سیتولوژی که به صورت تصادفی انتخاب شدند، شمرده و به این صورت تقسیم شد:۵۰ نمونه از بیماران سیتولوژی خوشخیم و ۱۶ نمونه با سیتولوژی بدخیم . پارامترهای بررسی شده شامل متوسط تعداد نقاط AgNOR در هسته یکصد سلول و درصد هسته‌هایی که ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ یا بیشتر نقاط AgNOR در هر سلول دارند، بود.

شمارش متوسط AgNOR در سلولهای بدخیم به طور واضحی بیشتر از سلولهای مزوتلیال تحریکی بود. نتیجه اینکه رنگ‌آمیزی AgNOR یک روش آسان و ارزان برای افتراق سلولهای مزوتلیال تحریکی از سلولهای بدخیم در مایعات افیوژن است.

کلمات کلیدی: افیوژنهای سروز، AgNOR، سلول مزوتلیال تحریکی، سلول بدخیم.

مقدمه

تجمع مایعات سروزی در حفره‌های بدن نظیر، پریکارد و پریتوان یکی از تظاهرات بدخیمی ارگان‌های مختلف به خصوص در سنین بالا می‌تواند باشد و گاه اولین تظاهر بدخیمی محسوب می‌شود(۲، ۳، ۹). در نئوپلاسمهای بدخیم مدتها پس از درمان و ورود به مرحله پسرفت(remission) پیدایش مایعات سروزی می‌تواند اولین علامت عود بیماری باشد(۱) که در این مورد پیدا کردن سلولهای بدخیم در مایعات راهنمای خوبی جهت ارزیابی پیش‌آگهی بیماری است(۲۵، ۳۱). تشخیص یک روند نئوپلازیک بدخیم در مایعات سروزی با یافتن سلولهای بدخیم در سیتولوژی حاصل می‌شود. به هر حال گاهی تجمع مایعات سروزی در روند بدخیمی حاوی سلولهای تحریکی مزوتلیال است که شکل آنها می‌تواند مشابه سلولهای بدخیم باشد(۱) ولی در واقع این سلولها ماهیت تحریکی دارند و در این موارد درگیری مستقیم پرده‌های سروزی پلور، پریتوان و پریکارد وجود ندارد (۴، ۱۰، ۱۶). تلاشهای فراوانی توسط سیتولوژیست‌ها در جهت ایجاد معیارهایی برای افتراق دقیق سلولهای بدخیم از سلولهای پیش سرطانی و تحریک شده در مایعات سروزی صورت گرفته است. تفسیر معیارهای مطرح شده بر اساس میکروسکوپ نوری مشکل و گاه با تشخیص‌های نادرست همراه است (۱۹، ۲۶). در این زمینه روشها و تکنیک‌های متعددی از جمله بررسی با میکروسکپ الکترونی، ایمنوهیستوشیمی(۷، ۹، ۱۵)، فلوسیتومتری و آنالیز مورفومتری به کار گرفته شده است (۱۷، ۲۵، ۲۹).

مناسب بودن آنتی‌بادی‌های ایمنوهیستوشیمی هنوز در این مورد ثابت نشده است چون سلولهای طبیعی و تحریکی نیز بیشتر این مارکرها را بروز می‌دهند (۲۷). بنابراین بررسی روش‌های قابل اطمینان برای افتراق سلولهای مزوتلیال تحریکی از بدخیم توصیه می‌شود که تکنیک رنگ‌آمیزی AgNOR یکی از این روش‌هاست (۲۷).

تکنیک بررسی پروتئینهای AgNOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Associated Proteins) به عنوان یکی از معیارهای فعالیت بیولوژیک پرولیفراتیو سلولی و مرکزی ژنهای کدکننده سنتز پروتئین می‌باشد که مارکر مناسب و

Archive of SID

www.SID.ir

مفیدی جهت افتراق سلولهای تحریک شده خوشخیم از سلولهای بدخیم که گاهی به طور دقیق شکل یکدیگر را تقلید می‌کنند، می‌باشند. پروتئین‌های AgNOR نواحی کروماتین هستکی و حلقه‌هایی از DNA در هستک می‌باشند که حامل ژن‌های کدکننده rRNA می‌باشد و همین اجزای رشته‌ای هستکی همراه با گروهی از پروتئین‌های غیرهیستونی اسیدی هستند که به طور انتخابی با نقره رنگ می‌گیرند (۹، ۱۴). تعداد و اندازه نقاط AgNOR با پرولیفراسیون و تقسیم سلولی ارتباط مستقیم دارد (۶، ۱۳، ۳۱) و امروزه با شمارش این نقاط در هستک به عنوان نشان مهمی در تمایز نئوپلاسم‌های خوشخیم از بدخیم استفاده می‌شود (۲۴). از آنجایی که مشکلات تشخیصی فراوانی با استفاده از میکروسکوپ نوری در رابطه با تمایز سلولهای تحریک شده خوشخیم از بدخیم در مایعات سروزی وجود دارد (۱۹)، برآن شدیم تا با استفاده از رنگ‌آمیزی AgNOR و مقایسه نتایج سیتولوژی با بیوپسی بافتی مربوطه با اطمینان بیشتر سلولهای مزوتلیال تحریک شده را از سلولهای بدخیم تمایز دهیم.

مواد و روش کار

نمونه‌ها: در این مطالعه از مایعات سروزی ارسال شده به بخش آسیب‌شناسی به طور تصادفی ۶۶ نمونه انتخاب شده و به دو گروه خوشخیم (۵۰ مورد) و بدخیم (۱۶ مورد) تقسیم شدند.

روش کار: مایعات سروزی ارسالی به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ یا به مدت ۲ دقیقه با ۱۰۰۰ rpm سیتواسپین شدند. پس از فیکس نمودن با الکل ۹۶ درجه، دو گروه اسلاید جهت رنگ‌آمیزی H&E و AgNOR تهیه شد. اسلایدهای تهیه شده به روش سانتریفوژ توسط H&E و اسلایدهای تهیه شده به روش سیتواسپین توسط نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند و پس از آبدهی و شستشوی اسلایدها با آب مقطر، رنگ AgNOR تازه تهیه شده مرکب از نیترات نقره (MERCK)، پودر ژلاتین، اسید فرمیک (Mallinckrodt) و آب مقطر یونیزه روی لام‌ها ریخته شد و به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه در محیط تاریک قرار داده شد. پس از شستشو، آب‌گیری و شفاف کردن، اسلایدها با لامل توسط چسب Entellan (MERCK) پوشانده شدند. سپس اسلایدها توسط دو پاتولوژیست مشاهده، نقاط AgNOR شمارش و سپس با نمونه‌های بافتی مقایسه شدند (۱).

روش ارزیابی : یکصد سلول از نمونه‌های سیتولوژی رنگ‌آمیزی شده به روش تصادفی انتخاب و با درشت‌نمایی (۱۰۰*) نقاط AgNOR شمارش شد. نقاط AgNOR به صورت نقاط سیاهرنگ در هسته سلولها دیده می‌شود. تمام نقاط داخل هسته‌ای شمارش شدند. در مواردی که تجمع نقاط به صورت غیرقابل تفکیک بودند، به صورت یک نقطه واحد در نظر گرفته شدند. تعداد نقاط AgNOR در سلولهای راکتیو درشت‌تر و منظم و در سلولهای بدخیم متعدد و کوچکتر می‌باشند (شکل ۱و۲).

ارزیابی اطلاعات: برای ارزیابی تعداد متوسط نقاط AgNOR و همچنین میزان پراکندگی (distribution score) سلول‌های تحریکی و بدخیم مایعات سروزی از آزمون t استفاده شد که با $P< ۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین برای تعیین معنی‌دار بودن، متوسط درصد سلولهایی که حداقل ۵ نقطه AgNOR را نشان دادند از آزمون t استفاده شد که در این مورد نیز با $P< ۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

نتایج

میانگین و دامنه نقاط شمارش شده AgNOR در یکصد سلول نمونه‌های بدخیم به طور معنی‌داری از میانگین و دامنه نقاط AgNOR در نمونه‌های خوشخیم بیشتر می‌باشد (جدول۱). پراکندگی متوسط نقاط AgNOR در دو گروه سیتولوژی منفی و مثبت در نمودار ۱ نشان داده شده است. برای بررسی distribution score، سلول‌هایی که ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نقطه AgNOR و یا بیشتر داشتند، شمارش و درصد سلول‌های ذکر شده محاسبه شد. درصد این سلولها در نمودار ۲ آورده شده ست.

جدول ۱: آمار توصیفی نقاط AgNOR در نمونه های سیتولوژی خوشخیم و بدخیم .

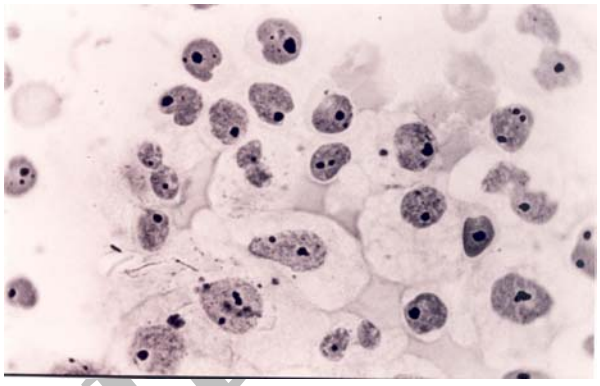
Archive of SID

www.SID.ir

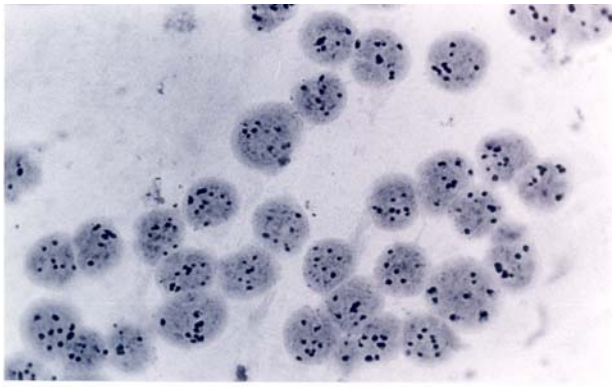
تعداد موارد	نتیجه سیتولوژی	متوسط نقاط AgNOR	انحراف معیار	دامنه تغییرات	واریانس
۵۰	خوشخیم	۱/۵	۰/۳	۱/۰۵-۴/۲	۰/۰۹
۱۶	بدخیم	۳/۷۷	۱/۴۴	۲/۱-۶/۲	۱/۵۷

Archive of SID

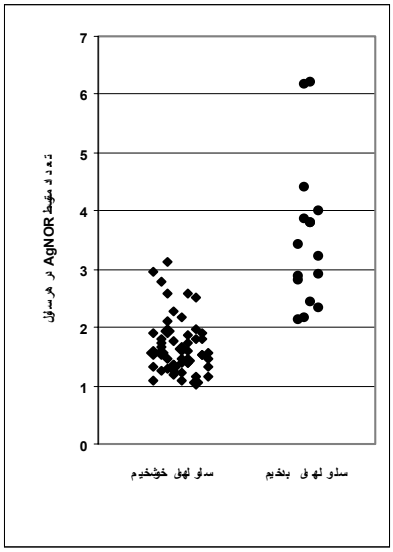
www.SID.ir



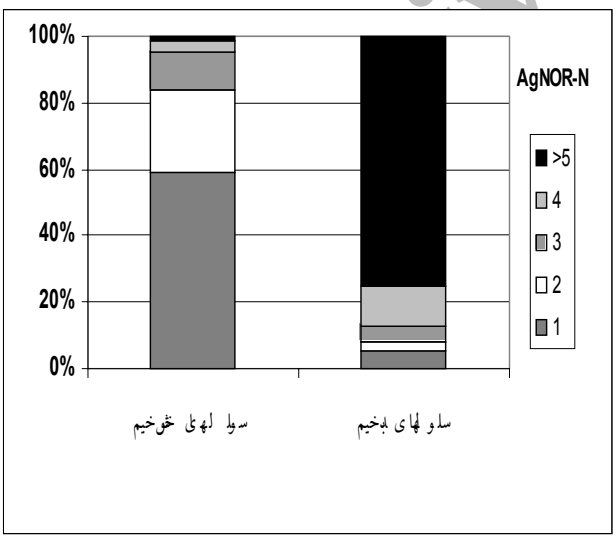
شکل ۱: AgNOR در سلولهای مزوتلیال خوش‌خیم با نقاط بزرگ و مشخص.



شکل ۲: AgNORدر سلولهای مزوتلیال بدخیم با نقاط فراوان کوچک و نامنظم.



نمودار ۱: پراکندگی متوسط نقاط AgNOR در دو گروه سیتولوژی خوشخیم و بدخیم.



نمودار ۲: درصد تعداد نقاط AgNOR در دو گروه سیتولوژی خوشخیم و بدخیم.

www.SID.ir

بحث

رنگ‌آمیزی پروتئین AgNOR نخست در سال ۱۹۸۶ از سوی Ploton و سپس در سال ۱۹۸۷ توسط Crocker و Nar به عنوان روشی در افتراق نئوپلاسم‌های بدخیم و خوشخیم معرفی شد(۳). نقاط سیاه رنگ AgNOR نه تنها از نظر تعداد و شمارش در ضایعات خوشخیم و بدخیم با هم متفاوتند بلکه اندازه، شدت رنگ‌پذیری و پراکندگی متفاوت نیز دارند(۸). در مطالعات سیتولوژیک افزایش مشخص و معنی‌داری بین نقاط AgNOR در سلولهای بدخیم در مقایسه با سلولهای خوشخیم دیده شده است (۲، ۱۸، ۲۸). رنگ‌آمیزی AgNOR روشی ساده و ارزان که نشانگر فعالیت پرولیفراتیو سلولی است، به شمار می‌رود. این رنگ‌آمیزی به عنوان معیاری مهم جهت افتراق سلولهای بدخیم از خوشخیم در مایعات سروزی به کار می‌رود.

تکنیک AgNOR در سالهای اخیر نه تنها در افتراق موارد بدخیم و خوشخیم نمونه‌های بافتی مفید بوده است بلکه به عنوان روشی موفق در ارزیابی‌های سیتوپاتولوژیک گستره‌های تهیه شده از مایعات مختلف بدن نیز مورد استفاده قرار گرفته است

(۵، ۲۰، ۲۲). این روش کمتر بر روی نمونه های سیتولوژی انجام می‌شود(۲۷) اما کاربرد آن مفید و سودمند است (۲۴).

لازم به ذکر است که این روش در نمونه‌های سیتولوژیک به علت فیکساسیون سریع و در برگرفتن جامع‌تری از نمونه، روش موفق‌تری برای تشخیص نمونه‌های بدخیم و خوشخیم در مقایسه با نمونه‌های هیستولوژیک می‌باشد (۲، ۱۸،۲۸). در این مطالعه همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، میانگین تعداد نقاط AgNOR در سلولهای خوشخیم ۱/۵ و در سلولهای بدخیم ۳/۷۷ می‌باشد.

Sujathan و همکاران متوسط ۱/۹۲ را برای سلولهای مزوتلیال تحریکی و ۴/۷۲ را برای سلولهای بدخیم پیدا کردند که کمی از متوسط مطالعه ما بالاتر می‌باشد. نتایج این تحقیقات از متوسط نقاط در گزارشهای قبلی پایین‌تر است. Rocher و همکاران متوسط نقاط را برای سلولهای مزوتلیال تحریکی ۴/۸۸ و برای سلولهای بدخیم ۱۳/۷۸ گزارش کردند(۲۱). Huangو همکاران نیز اعداد مشابهی را به دست آوردند(۱۱). در مطالعه دیگری نیز تعداد متوسط این نقاط به ترتیب ۲/۳ و ۶/۷ بیان شده است (۱۲).

همانطور که از تمامی این مطالعات فهمیده می‌شود، تعداد نقاط AgNOR در تمام اشکال بدخیمی در مقایسه با موارد خوشخیم بالاتر می‌باشد(۲۷). سلولهای مزوتلیال تحریکی و سلولهای بدخیم مایعات سروزی بدن با تکنیک رنگ‌آمیزی AgNOR تفاوت معنی‌داری را در تعداد نقاط هسته‌ای نشان داده‌اند. Derenzini و همکاران با مطالعه بر روی سیتولوژی مایع پلور این مسئله را ثابت کرده‌اند(۶). با کمک آزمون t در مطالعه ما نیز این تفاوت معنی‌دار بوده است.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر که تائیدکننده مطالعات پژوهشگران دیگر می‌باشد، روش رنگ‌آمیزی AgNOR به عنوان یک روش کمکی ارزان و ساده در افتراق سلولهای مزوتلیال تحریکی از سلولهای بدخیم در مواردی که در تشخیص سیتولوژیک با مشکل روبرو هستیم، می‌تواند کمک کننده باشد. علاوه بر آن مزیت مهم دیگر این روش قابلیت انجام آن روی اسلایدهای رنگ‌زدایی شده پاپانیکولائو و گیمسا است (۲۹).

اکثر مؤلفین ضمن تأکید بر فواید و ارزش بالای تکنیک AgNOR در افتراق ضایعات بدخیم و خوشخیم از نمونه‌های هیستوپاتولوژیک و سیتوپاتولوژیک روی این مسئله تمرکز دارند که جهت استاندارد کردن این تکنیک قدمهای مؤثری از جمله Computer assisted image analysis باید برداشت تا خطاهای چشمی در شمارش و ارزیابی نقاط AgNOR را به حداقل برساند.

References

1. Antonangelo L., Saldiva P., Amaro E., Capelazzi V., 1994, Utility of computerized morphometry combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. Anal Quant. Cytol. Histol., 16(4): 247-252.
2. Aynes J .G., Crocker J., Skilbeck N. Q., 1988,

Archive of SID
www.SID.ir

Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells using the AgNOR technique, Thorax, 43:366-370.
3. Crocker J., Eagan M. J., 1987, Correlation between NOR size and numbers in non Hodgkin's lymphomas, J. Pathol., 40: 885-889.
4. Dekker A., Bupp P. A., 1978, Cytology of serous effustions: An investigation into the usefulness of cell blocks versus smears, Am. J. Clin. Pathol., 70: 855-860.
5. Derenzini M., Nardi F., Farabegoli F., Ottinetti A., Roncaroli F., Bussolati G., 1989, Distribution of silver-stained interphase nucleolar organized regions as a parameter to distinguishing neoplastic from non-neoplastic reactive cells in human effusions, Acta Cytol., 4: 491-498.
6. Drenzini M., Trere D., Pession A., *et al.,* 1991, Nucleolar size indicates the rapidity of cell prolifration in cancer tissue, J. Path., (2): 181-6.
7. Estaban J. M., Yokota S., Husain S., Battifora H., 1990, Immunocytochemical profile of benign and carcinomatous effusion, Am. J. Clin. Pathol., 4: 698-705.
8. Field D., Fitzgerald P. H., Sin F. Y. T., 1984, Nucleolar silver staining related to cell cycle and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes, Cytobios., 41: 23-32.
9. Ghosh A. K., Spriggs A. l., Taylor-Papadimitriou J., Mason D. Y., 1983, Immunocytochemical staining of pleural and pertioneal effusions with a panel of monoclonal antibodies, J. Clin. Pathol., 36: 1154-1164.
10. Honigman A. H., 1978, The significance of tumor cells in serous effustions, Surg. Gynecol. Obstet., 81: 295-301.
11. Huang M. S., Tsai M. S., Hwang J. J., Wang T. H., 1994, Comparison of nucleolar organizer regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusions, Thorax, 49(11): 1152-6.
12. Jian S., Zeng Z., Liago Z., 1998, Study on diagnostic value of analyzing argyrophilic nucleolar organizer regions in benign and malignant pleural effusions, Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 21(1): 34-36.
13. Kavasaki F., Onoda N., Ishikawat *et al.,* 2000, Evaluation of (AgNOR) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence, Oncol. Re., 7(4), 853-7, 2000.
14. Lauritzen A. F., 1987, Distinction between cells in serous effusions using a panel of antibodies, Virchows Arch A Pathol. Anat. Histopathol., 411: 299-304.
15. Marcheveky A. M., Gil J., Jeanty H., 1987, Computerized interactive morphometry in pathology: Current instrumentation and methods, Hum. Pathol., 18: 320-331.
16. Matthay R. A., Coppage L., Shaw C., Filderman A. E., 1990, Malignancies metastatic to the pleura, Invest. Radiol., 25: 601-619.
17. Mezger J., Permanetter W., Gerbes A. L., Wilmanns W., Lamerz R., 1988, Tumor associated antigens in diagnosis of serous effusions, J. Clin. Pathol., 41: 633-643.
18. Mezger J., Stozer O., Schilli G., Bauer S., Wilmanns W., 1992, Identification of carcinoma cells in ascitic and pleural fluid: Comparison of four panepithelial antigen with carcinombryonic antigen, Acta Cytol., 36: 75-81.
19. Monte S. A., Ehya H., Lang W. R., 1987, Positive effusion cytology as the initial presentation of malignancy, Acta Cytol., 31: 448-452.
20. Pomjanski N., Motherby H., Buckstegge B., Knops K., Rohn B. L., Bocking A., 2001, Early diagnosis of mesothelioma in serons effusions using AgNOR analysis, Anal. Qual. Cytd. Histol. ,23(2): 151-160.
21. Rocher A. E., Blanco A. M., Palaoro L. A., 2000, Usefulness of AgNOR technique in the interpretation of serous effusions, Rev. Med. Chil. ,128(9): 963-968.
22. Ruschoff J., Plate K. H., Bittinger A., 1989, Application of the AgNOR method to cell imprints, J. Pathol., 158:333.
23. Sann S. A., Good J. f., I. R., 1988, Pleural fluid malignant effusion: diagnostic, prognostic and therapuetic implication, J. Internal Med., 108: 346-349.
24. Shechtman L., Korer R., Horowitz A., Schechtman I., Halpern M., Oral R., 1998, Diagnostic value of AgNOR staining in thyroid cytology, Anal. Quant. Cytol. Histol., 20(3): 187-191.
25. Stonesifer K. J., Xiang J., Wilkinson E. J., Benson N., Brayian R. C., 1987, Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids, Acta Cytol., 31: 125-130.
26. Storey D. D., Dines D. E., Coles D. T., 1976, Pleural effusion: a diagnosis dilemma, JAMA, 236: 2183-2186.
27. Sujathan K., Kannan S., Pillai K. R., Chandrakeha B., Amma N. S., Nair M. K., 1996, Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions, Acta Cytol., 40: 724-728.
28. Rocher A. E., Blanco A. M., Palaoro L. A., 2000, Usefulness of AgNOR technique in the interpretation of serous effusions, Rev. Med. Chil. 128(9): 963-968.
29. Unger K. M., Raber M., Bedrossian C. W., Stem D. A., Barlogie B., 1983, Analysis of pleural effusion using automated flow cytometry, Cancer, 52: 837-877.
30. Yamada S., Takeda T., Matsumoto K., 1983, Prognostic analysis of malignant pleural and peritoneal effusions, Cancer, 51: 136-140.
31. Zaczek M., Szot W., Chlap Z., 1996, Argyrophilic nucleolar organizer regions in proliferative lesion of the thyroid gland, Anal. Quant. Cytol. Histol., 18(1), 1-8.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)