تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۷، ۲۵۴-۲۵۸

بررسی میانگین نقاط سازمان دهنده هسته در ضایعات فکی حاوی سلول ژانت با رنگ‌آمیزی نیترات نقره

دکتر دنیا صدری[۱] - دکتر نصرت اله عشقیار[۲] - دکتر فاطمه مشهدی عباس[۳] - دکتر فاطمه نصراللهی[۴]

۱- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی(واحد تهران).

۲- دانشیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۳- استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

۴- دندانپزشک.

چکیده

زمینه و هدف: *ضایعات فکی حاوی سلول ژانت از لحاظ میکروسکوپی مشابه و از لحاظ رفتار بیولوژیک متفاوت هستند. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات بیولوژیک ضایعات فوق با استفاده از تکنیک AgNOR است که نشانگر پرولیفراسیون سلولی می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی تعداد ۴۲ نمونه به روش آسان و در دسترس انتخاب شد و لام‌های H&E آنها توسط پاتولوژیست دهان و فک و صورت مورد بازبینی قرار گرفت سپس بلوک‌های مربوطه جدا شده و رنگ‌آمیزی نیترات نقره طبق روش Ploton انجام شد. در هر لام صد سلول در بزرگنمایی۱۰۰۰ × عدسی شئی میکروسکوپ نوری Nikon Ys100 بررسی شده وتعداد نقاط رنگ گرفته در آنها شمارش گردید. سپس میانگین سلول‌های شمارش شده در هر گروه از ضایعات محاسبه و با گروههای دیگر مقایسه گردید. واریانس یک سویه جهت مقایسه میزان AgNOR در گروههای مذکور انجام شد.*

یافته‌ها: *از ۴۲ نمونه مورد بررسی۲۱ مورد CGCG با میانگین شمارش (۰/۲۹ ± ۰/۸۵)، هشت مورد ABC با میانگین شمارش (۰/۳۲ ± ۰/۷۶) مورد چرابیسم با میانگین شمارش (۰/۱۰ ± ۰/۸۷) شش مورد تومور براون مرتبط با هایپرپاراتیروئیدیسم با میانگین شمارش (۰/۱۶ ± ۰/۸۲) نقاط سازمان دهنده هسته بودند.GCT به دلیل وجود تنها یک نمونه در محاسبات آماری حذف شد. تفاوت معنی‌داری بین شمارش AgNOR در این گروهها و ارتباط آن با خصوصیات کلینیکی آنها دیده نشد.*

نتیجه‌گیری: *ضایعات داخل فکی حاوی سلول‌های ژانت از لحاظ بروز AgNOR و قدرت تکثیر سلولی با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.*

کلید واژه‌ها: *ضایعات ژانت سل فکی – رنگ‌آمیزی AgNOR – قدرت پرولیفراسیون.*

وصول مقاله: ۱۳۸۶/۱۲/۱۱ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۴/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۲۹

نویسنده مسئول: گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان وفک وصورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی(واحد تهران) e.mail:Donia1351@yahoo.com

مقدمه

ضایعات فکی حاوی سلول ژانت از لحاظ مشخصات هیستوپاتولوژیک به طور قابل ملاحظه‌ای شبیه یکدیگرند در حالی که مشی بالینی آنها متفاوت است. وجه مشترک آنها حضور کم یا زیاد سلول‌های های ژانت چند هسته‌ای در زمینه حاوی سلول‌های مزانشیمی بیضی تا دوکی شکل است.(۱)، این ضایعات شامل : گرانولومای مرکزی با سلول ژانت (CGCG)، چروبیسم، تومور براون مرتبط با هایپرپاراتیروئیدیسم و تومور سلول ژانت (GCT) می‌باشند.(۲-۳)

از جمله روشهایی که در سالهای اخیر در سایتولوژی و پاتولوژی کاربرد پیدا کرده است رنگ‌آمیزی با محلول نیترات نقره یا روش AgNOR است. در این روش نواحی موسوم به NOR در هسته رنگ‌آمیزی می‌شود.(۴)، NOR معرف حلقه‌هایی از DNA هستند که به طور فعال از آنها RNA ریبوزومال نسخه برداری می‌شود و در نهایت منجر به سنتز پروتئین می‌گردد. NOR در ارتباط با پروتئین‌های اسیدیک، نقره دوست و غیرهیستونی هستند که با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نقره (AgNOR) قابل مشاهده

می‌باشند.(۴- ۵)، در تحقیقهای متعدد با استفاده از تکنیک AgNOR همبستگی بین تعداد AgNOR در هسته و فعالیت پرولیفراتیو سلولی در ضایعات پاتولوژیک مختلف مثل تومورهایی با منشا اپیتلیالی و ملانوسیتیک گزارش شده است.(۶- ۸)

در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ توسط Paulo E.A.de Souza و همکاران انجام شد بروز نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی P53,MDM2,Ki67,PCNA در CGCG و تومور سلول ژانت بررسی گردید، یک سوال اساسی وجودداشت که آیا هر دو ضایعه ماهیت جداگانه دارند یا این که اشکال گوناگون از یک بیماری یکسان‌اند؟ نتایج ثابت کردند CGCG یک فعالیت پرولیفراتیو بالاتری در مقایسه با GCT دارد در حالی‌که رفتار بالینی GCT خطرناکتر می‌باشد.(۹)

از آن زمان محققان مطالعات بسیاری را برای بررسی خصوصیات بیولوژیک ضایعات حاوی سلول ژانت با استفاده از نشانگرهای سلولی متمرکز کردند و نتایج متفاوتی در برداشت.(۱۰- ۱۱)

هدف از این مطالعه بررسی ماهیت بیولوژیک ضایعات فکی حاوی سلول ژانت با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره و بررسی نقاط سازمان دهنده هسته می‌باشد.

روش بررسی

نوع مطالعه توصیفی است و تکنیک جمع‌آوری نمونه از نوع آسان و در دسترس می‌باشد. تعداد نمونه‌ها با توجه به مقالات مشابه و شیوع کم بعضی از نمونه‌ها ۴۲ مورد انتخاب شد که شامل ۲۱ مورد CGCG، هشت مورد ABC ، شش مورد چرابیسم و شش مورد تومور براون مرتبط با هایپرپاراتیروئیدیسم و یک مورد GCT بوده است. با مراجعه به بخش آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی، تهران و انستیتو کانسر امام نمونه‌هایی که با تشخیص ضایعات ژانت سل فکی بودند، جدا شده و لام‌های هماتوکسین- ائوزین آنها توسط پاتولوژیست فک و دهان مورد بازبینی قرارگرفت. معیار تشخیص چروبیسم بررسی نمای رادیوگرافیک و بررسی میکروسکوپی لام‌های موجود در آرشیو و بررسی پرونده بالینی بیمار طبق معیارهای ذکر شده در کتاب مرجع بود.(۱)، در رابطه با تومور براون مرتبط با هایپرپاراتیروئیدیسم علاوه بر عوامل فوق بررسی نتایج آزمایشات پاراکلینیکی (Ca,P,Alk) ثبت شده در پرونده بالینی بیماران بازبینی شد، پس از تأیید تشخیص پاتولوژی، بلوک‌های مربوطه جدا شده و جهت رنگ‌آمیزی نیترات نقره برش پنج میکرونی از آنها تهیه گردید. رنگ‌آمیزی نیترات نقره طبق روش Ploton انجام شد.(۱۲)، لام‌های ثابت شده، طبق روش استاندارد با محلول نهایی شامل یک حجم ژلاتین ۲ ٪ در محلول اسید فرمیک ۱٪ و دو حجم محلول نیترات نقره ۵۰٪ رنگ‌آمیزی شد، به این صورت که اسلایدها ابتدا به صورت افقی در داخل یک ظرف پتری قرار داده شدند و توسط پیپت، ۳- ۴ قطره از محلول مورد نظر بر روی سطح آنها ریخته شد، سپس اسلایدها توسط یک درپوش شیشه ای پوشانده شدند و به مدت سی دقیقه در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردید. پس از آن درپوش شیشه‌ای به آرامی برداشته شد. اسلایدها در آب مقطر شسته شدند و توسط Xylene دهیدراته و در یک Synthetic medium مانت شدند سپس لام‌های مورد نظر توسط آسیب شناس فک و دهان و انترن آموزش دیده دندانپزشکی جهت شمارش NOR (نقاط سازمان دهنده هسته‌ای) که به رنگ قهوه‌ای تا سیاه دیده می‌شوند، بررسی گردید. در هر لام صد سلول تک هسته تا چند هسته در بزرگنمای ۱۰۰۰ × عدسی شیئ میکروسکوپ نوری NikonYS100 بررسی شده و تعداد نقاط رنگ گرفته در آنها شمارش گردید به این صورت که در هر لام از ناحیه سمت چپ نمونه شمارش آغاز و تعداد ده فیلد به طور اتفاقی انتخاب شدند. در هر فیلد نیز ده عدد سلول به طور اتفاقی انتخاب و نقاط قهوه‌ای یا سیاه رنگ داخل هسته‌ها شمارش شدند. نقاط به هم پیوسته و نقاط روی هستک به عنوان یک نقطه محاسبه گردید. نواحی نکروز، اماس شدید و ارتیفکت محاسبه نشدند.(۱۳)، به منظور تأیید صحیح بودن تکنیک رنگ‌آمیزی مورد استفاده و اختصاصی بودن آن در تمام مراحل از شاهد مثبت و منفی استفاده شد.لام مربوط به سرطان پستان که بروز AgNOR قوی داشت به عنوان شاهد مثبت و بافت فیبروکلاژن اطراف گرانولوم دندانی به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. ضریب توافق دو مشاهده گر با به کارگیری آمار کاپا محاسبه شد. در موارد اختلاف دو مشاهده گر در شمارش سلول‌های مثبت میانگین دو عدد شمارش شده مورد تأیید قرار گرفت. سپس میانگین سلول‌های شمارش شده در هر گروه از ضایعات محاسبه

شده و با گروههای دیگر با استفاده از آزمون آنالیز واریانس(سایر ضایعات ژانت سل فکی) مقایسه گردید.

یافته‌ها

باتوجه به‌اینکه تنها یک نمونه تومورسلول ژانتGCT موجود بود لذا در محاسبات آماری حذف شد و تعداد نمونه‌ها ۴۱ مورد در نظر گرفته شد. میزان شمارش AgNOR به ترتیب ابتدا در گروه چروبیسم (با میانگین ۰/۸۷)، پس از آن در گروه ژانت سل گرانولوم مرکزی CGCG (با میانگین ۰/۸۵)، سپس در گروه تومورباروان(با میانگین ۰/۸۲) و در نهایت در گروه کیست استخوانی انوریسم ABC(با میانگین۰/۷۶) مشاهده می‌شود.وبا تأکید بر میزان F به دست آمده که پایینتر از میزان (F=۰/۲۵) که پایینتر از میزان F جدول است، می‌توان مطرح کرد که تفاوت معنی‌داری بین شمارش AgNOR در چهار گروه CGCG، ABC، Cherubism وBrown tumor در سطح α=۰/۰۵، مشاهده نمی‌شود.

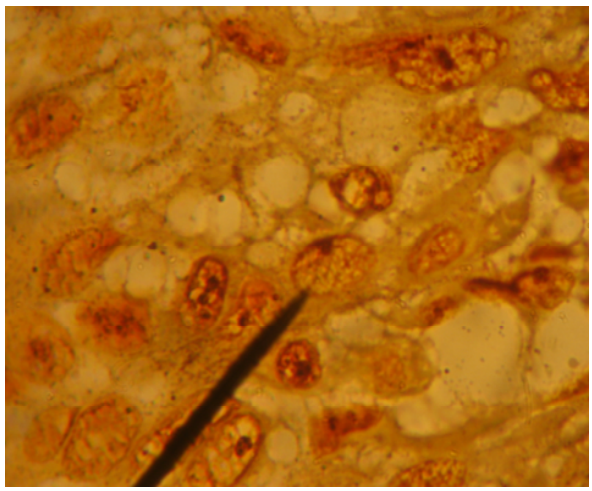
جدول ۱: بررسی مقایسه ای نقاط سازمان دهنده هسته در چهار گروه ضایعات فکی حاوی سلول ژانت

سطوح	میانگین	انحراف معیار	تعداد
ژانت سل گرانولوم مرکزی	۰/۸۵	۰/۲۹	۲۱
کیست استخوانی انوریسم	۰/۷۶	۰/۳۲	۸
چروبیسم	۰/۸۷	۰/۱۰	۶
تومور براون	۰/۸۲	۰/۱۶	۶

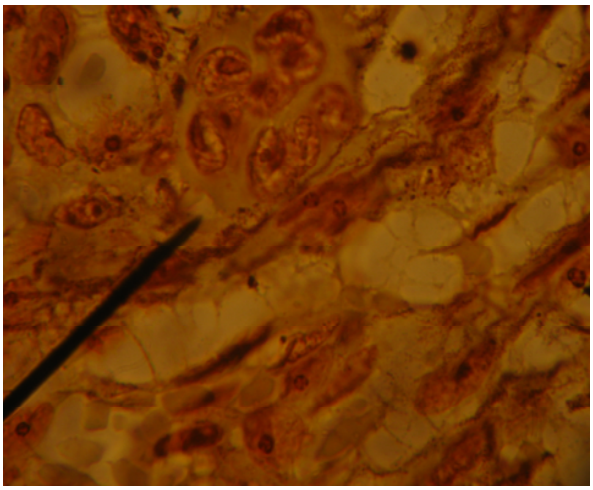
بحث

نتایج این مطالعه نشان داد میزان بروز نقاط سازمان دهنده هسته (AgNOR) به دنبال استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره در بین گروههای مختلف ضایعات حاوی سلول ژانت فکی با هم اختلاف معنی‌داری ندارد و نمی‌توان از این روش جهت تشخیص میکروسکوپی ضایعات حاوی سلول ژانت استفاده کرد. این امر می‌تواند ناشی از چند مسئله باشد. این رنگ‌آمیزی (شمارش NOR) می‌تواند در تومورها و ضایعات نئوپلاستیک روش قابل اهمیتی جهت طبقه بندی ضایعات با رفتارهای بالینی مختلف باشد(۷- ۸) اما در ضایعاتی که مشی نئوپلاستیک ندارند و تنها رفتار تهاجمی از خود نشان می‌دهند، نمی‌تواند کارایی لازم را داشته باشد، همان طور که در مطالعه بر روی انواع میکروسکوپی املوبلاستوما و انواع مختلف CGCG با رفتار تهاجمی و غیرتهاجمی این امر دیده شد.(۱۰ و ۱۴)، نکته دیگر که از نتایج این مطالعه حاصل می‌شود این است که عدم وجود اختلاف آماری در بروز AgNOR در ضایعات فوق می‌تواند تأیید کننده این نظریه باشد که کلیه ضایعات حاوی سلول ژانت را در واقع یک ضایعه منفرد می‌داند که به اشکال مختلف بالینی بروز می‌کند.(۱۵) البته لازم به ذکر است که تعداد کم نمونه‌ها در بعضی گروهها که ناشی از شیوع کم آنهاست، می‌تواند در نتایج حاصله مؤثر باشد. مطالعات جدید پیشنهاد می‌کند که غیر از شمارش NOR می‌بایست به اندازه نقاط و پراکندگی آنها نیز توجه ویژه‌ای کرد، چون ممکن است مورد اختلاف بین ضایعات گوناگون در همین نکات باشد.(۱۶)،در این مطالعه چروبیسم با میانگین شمارش AgNOR (۰/۱۰ ± ۰/۸۷) بیشترین بروز NOR را نشان داد که این امر می‌تواند ناشی از جوان بودن سلول‌های مزانشیمی در این ضایعه و پرولیفراسیون بیشتر آنها باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های تک هسته زمینه مزانشیمی شامل هیستوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها بروز NOR را با شدت و تعداد بیشتر نشان دادند و هسته سلول‌های ژانت به ندرت نقاط سازمان‌دهنده هسته را نشان می‌داد. (شکل ۱و۲)، مطالعات Regezi نیز در رابطه با آنتی‌ژنKi67 که مارکر پرولیفراسیون است نیز این امر را تأیید می‌کند(۱۰) و به این نکته اشاره دارد که قدرت تخریبی و مشی فعال ضایعات حاوی سلول ژانت ناشی از حضور سلول‌های فعال زمینه‌ای است و سلول‌های ژانت چند هسته در این زمینه نقش چندانی ندارند، اما مطالعه Veredدر سال۲۰۰۶ بر روی عوامل رگ‌ساز نشان می‌دهد علاوه بر سلول‌های تک هسته زمینه‌ای، سلول‌های ژانت نیز واجد رسپتورهایی در پاسخ به عوامل رگ‌ساز می‌باشند و نقش مهمی در تسهیل فرآیند استئوکلاستوژنزیس در ضایعات CGCG دارند.(۱۱)، در این مطالعه CGCG از لحاظ بروز AgNOR در مقام دوم قرار داشت و بیشتر از ABC و براون تومور فعالیت پرولیفراتیو نشان می‌داد. مطالعات Souza نیز در بررسی مارکرهای پرولیفراسیون PCNA و

Ki67 نشان دادCGCG نسبت به GCT قدرت پرولیفراسیون بیشتری دارد.(۹)، مطالعه همین پژوهشگر در سال ۲۰۰۰ بر روی ضایعات مرکزی و محیطی حاوی سلول ژانت نشان می‌دهد با این که رفتار انواع مرکزی این ضایعات تهاجمی می‌باشد ولی نوع محیطی این ضایعات مارکرهای پرولیفراسیون را با قدرت بیشتر نشان می‌دهد.در رابطه با بروز AgNOR نیز بین انواع محیطی و مرکزی ضایعات حاوی سلول ژانت اختلاف معنی‌داری دیده نشد.(۱۷)،در این مطالعه بروز بیشتر NOR در زمینه مزانشیمی و به ویژه در اطراف استخوانهای راکتیو در حال ساخت دیده شد،رنگ گرفتگی نقاط به صورت تک نقطه و در بعضی قسمتها به صورت خوشه‌ای بود. مطالعات Souza در سال ۲۰۰۰ تنها تعداد نقاط سازمان دهنده هسته (NOR) را مورد بررسی قرار داده و به نحوه پراکندگی یا اندازه آنها اشاره‌ای نکرده است.(۱۷)، این در حالی است که مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ بر این امر تأکید دارد که می‌بایست معیارهای جدیدی جهت ارزیابی اندازه و پراکندگی نقاط (NOR) ارائه شده و در بررسیها مد نظر قرار بگیرد.(۱۶)



شکل ۱: سلول‌های مزانشیمی زمینه در چروبیسم (نوک پیکان) با رنگ‌آمیزی نیترات نقره بزرگنمایی هزار(NOR) به صورت نقاط سیاه دیده می‌شوند.



شکل ۲: سلول‌های ژانت چند هسته (نوک پیکان) با رنگ‌آمیزی نیترات نقره در بزرگنمایی هزار(NOR) به صورت نقاط سیاه دیده می‌شوند.

نتیجه‌گیری

ضایعات داخل فکی حاوی سلول ژانت شامل ABC،CGCG ، چرابیسم و براون تومور مرتبط با هایپرپاراتیروئیدیسم از لحاظ بروز AgNOR با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

REFERENCES

1. Neville BW,Dam DD,Allen CM,Bouquot JE.Oral and maxillofacial pathology,2nded.Philadelphia:WB Saunders; 2002,544-552.
2. Regezi J,Sciubba JJ,Jordan R.Oral pathology,Clinical pathologic correlations,4thed. St.Louis:WB Saunders;2003, 418.
3. Sapp JP, Eversole LR, Wysoki GP.Contemporary oral and maxillofacial pathology,NewYork;Mosby1997,117-26.
4. Sampaio H,Loyola AM,Gomez RS,Mesquita RA.AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa ,Effect of smoking. Acta Cytol. 1999Mar-Apr; 43(2):117-20.

5. Cardillo MR. AgNOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses.Acta Cytol. 1992 Mar-Apr; 36(2):147-51.
6. De Rosa I,Staibano S,Lomuzio l,Delfino M,Lucariello A,Coppola A,et al.Potentially malignant and malignant lesions of the lip,Role of silver staining nucleolar organizer regions,Proliferating cell nuclear antigen,P53.and c-myc in differention and prognosis.J Oral Pathol Med. 1999Jul;28(6):252-58.
7. Tuccari G,Giuffre G,Catalano A,Lentinim A,Batolo D.Standardized AgNOR analysis in actinic kratosis. Am J Dermatopathol. 2001Oct; 23(5):407-12.
8. Pillai KR,Sujathan K,Kannan S,Abraham EK,Mathew B,Amma NS,Nair MK,Menon P. Argyrophilic nucleolar organizer regions in the evaluation of tumour progression in the oral mucosa:Correlation with tissue pathology mucosa:Correlation with tissue pathology J Cancer Res Clin Oncol. 1994 Dec; 120(12):723-26.
9. De Souza PE,Paim JF,Carvalhais JN,Gomez RS. Immunohistochemhcal expression of p53,MDM2, Ki67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor.J Oral Pathol Med. 1999 Feb;28(2);54-8.
10. Miriam O M, Pogrel MA, Jeffery CB. Stewart, Rebeka G. Silva, Regezi J.Central giant cell granulomas of the jows: Phenotype and proliferation-associated markers. J Oral Pathol Med. 1997April; 26(4): 159-163.
11. M. Vered, A. Buchner, D. Dayan. Giant cell granuloma of the jowbons - a proliferative vascular lesion ? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. J Oral Pathol Med. 2006 Nov; 35(10): 613-619.
12. Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Andent J. Improvement the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer region at the optical level.histochem J. 1986 Jan;18(1):5-14.
13. SargolzaeeS, Ahmadnejad M, Nafarzade SH. [Evaluation of mean AgNOR in squamous cell carcinoma of oral mucosa]. Dent J of Shahid Beheshti University of Medical Science. Spring 2007;25(1):41-45.(Persian)
14. Payeras MR, Sant Ana Filho M, Lauxen IS, Barbachan JJ. Quantitative analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions and epidermal growth factor receptor in ameloblastomas. J Oral Pathol Med. 2007Feb:36(2): 91-104.
15. Dabiri P, Shams SH, Dabirzade F.[Tumors pathology]. Vol 6.Pathology of Bone Tumors. 1thed. Iran Institue of Biology, Molecular and Biophisic Tehran; 2002:349-369.(Persian)
16. Bukhari M H, Niazi S, Akhter khan S. Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. Int J Exp Path. 2007 Feb;88(1):47-53.
17. SouzaPE, Mesquita RA, Gomez RS. Evaluation of P53,PCNA,Ki67,MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. Oral diseases. 2000 Jan;6(1):35-9.