مطالعه پراکندگی و تعداد ذرات پروتئینهای همراه هستکها (NOR) در گاستریت و کارسینومای معده

محمدرضا عرب Ph.D.☆♦، شیراحمد سارانی Ph.D.☆، طاهره طلایی خوزانی Ph.D.☆، مهربد کریمی Ph.D.★، محمدحسن حیدری Ph.D.★، علیرضا فاضل Ph.D.★، ضیاالدین تابعی Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه آسیب‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

☆ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

☆ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه آسیب‌شناسی

♦ آدرس مکاتبه: زاهدان، صندوق پستی ۹۸۱۵۷، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** شناسایی الگوی پراکندگی و تعداد ذرات NOR (Nucleolar organizer region) در گاستریت و کارسینومای معده.

* **مواد و روشها:** تعداد ۴۰ بیمار با متوسط سن ۴۵ سال با تشخیص گاستریت (۳۰ بیمار) و کارسینوما (۱۰ بیمار) مورد مطالعه قرار گرفت. بلوکهای پارافینی از فایل آسیب‌شناسی بیمارستانهای خاتم الانبیاء زاهدان و نمازی شیراز در سالهای ۸۰-۷۹ انتخاب شدند. از این بلوکها مقاطعی با ضخامت ۵-۳ میکرومتر بریده شد و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره کلوئیدی و H-E رنگ‌آمیزی و تعداد ذرات به صورت دو سوکور شمارش شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از این مطالعه همبستگی زیادی را بین دو فرد برای شمارش ذرات نشان داد ($r=0/97$، $P<0.001$). تست Mann-Whitney اختلاف معناداری را برای تعداد ذرات NOR در گاستریت و کارسینوما نشان داد ($P<0.001$). شکل ذرات NOR و توزیع آنها در گاستریت به صورت ذرات کوچکی درون هسته بود، در حالی که در سلولهای سرطانی تعداد و اندازه NOR به شدت افزایش نشان می‌داد.

* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تعداد ذرات NOR می‌تواند نماینده خوبی از تغییرات پرولیفراتیو سلولی در کارسینومای معده باشد.

گل واژگان: NOR، گاستریت، کارسینوما، معده

مقدمه

علیرغم کاهش میزان مرگ و میر ناشی از سرطان معده، این بیماری همچنان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در اثر بدخیمیها به شمار می‌رود (۱). کاهش میزان مرگ و میر در این بیماری مرهون پیشرفتهای فراوانی است که به وسیله تکنیکهای مختلف جهت شناسایی زود هنگام این بیماری به دست آمده است (۲). هستکها واحدهای فیزیولوژی تعریف شده‌ای در سلولهای یوکاریوتیک هستند که محل سنتز ریبوزومها می‌باشند (۳). پروتئینهای همراه هستکی NOR (Nucleolar organizer region) نیز دسته‌ای از پروتئینهای غیرهیستونی هستند که در عمل نسخه برداری r-DNA و پردازش r-RNA دخالت دارند. میزان این پروتئینها در هسته سلول انعکاسی از وضعیت تقسیم سلولی است، به طوری که افزایش میزان این پروتئینها در مرحله عبور سلولها از فاز G1 به S در چرخه زندگی سلولی نشان داده شده است (۴). به علاوه از آنجائی که این پروتئینها دارای قابلیت رسوب با نیترات نقره کلوئیدی می‌باشند (۳)، مورد توجه محققین و پاتولوژیستها قرار گرفته‌اند (۵، ۶، ۱۶). پروتئینهایی مانند B23، توپورایزومراز I، فیبریلارین و فسفوپروتئینهای ۱۰۵ و ۱۳۵ کیلو دالتونی از پروتئینهای اساسی نواحی NOR در هستک سلولها هستند (۴).

در سلولهای اینترفازی، نواحی NOR معمولاً به صورت یک ذره در هسته سلول قابل رویت هستند حال آنکه درمورد سلولهای در حال تقسیم، نواحی NOR به صورت فشردگی ثانویه Secondary constriction مستقر در کروموزومهای آکروسنتریک ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ مشاهده می‌شوند (۳). مطالعات Derenzini و همکارانش نشان داده است که اندازه و موقعیت مکانی هستکها با سیکل سلولی ارتباط دارد (۴) و ارتباط مستقیم تکنیک NOR با درصد سلولهائی که در فاز S تقسیم سلولی هستند برای لنفوم غیر هوچکینی نیز نشان داده شده است (۳). پروتئینهای NOR در تشکیل زیر واحدهای ریبوزومی به عنوان دستگاه سنتز پروتئین سلول نقش دارند (۴). اهمیت تکنیک ارزان قیمت NOR برای نشان دادن میزان فعالیتهای پرولیفراتیو سلولی در مقابل روشهای گران قیمتی مثل آنتی بادیهای مونوکلونال و یا Flow Cytomerey یکی از دلایل توجه به این تکنیک رنگ‌آمیزی است (۷). قابلیت این رنگ‌آمیزی به عنوان یک روش کمکی همراه با رنگ‌آمیزی همانوکسیلین - ائوزین در تشخیص ضایعاتی مانند سیروز کارسینوم هپاتو سلولار نشان داده شده است (۸). همچنین توانائی این تکنیک رنگ‌آمیزی به منظور نمایش اندیکس میتوزی برای تعداد زیادی از تومورها مورد تأکید قرار گرفته است (۹، ۱۰). از سوی دیگر این تکنیک علیرغم توانائی برای نشان دادن فعالیت میتوزی قادر به تفکیک درجات مختلف دیسپلازی در معده نیست و اختلاف تعداد ذرات NOR بین گروههای دیسپلازی از یک طرف و کارسینوما از طرف دیگر نیز معنادار است (۱۱). اهمیت رنگ‌آمیزی NOR در تفکیک ضایعات خوش خیم و بد خیم پرومناتی نیز نشان داده شده است (۱۲). هدف از این مطالعه شمارش تعداد ذرات NOR و تعیین الگوی آن در گاستریت به عنوان یک ضایعه التهابی و مقایسه آن با کارسینومای معده به عنوان مرحله نهائی تغییرات هیستولوژیک روند بدخیمی در معده بود.

مواد و روشها

لامهای رنگ آمیزی شده هماتوکسیلین و ائوزین ۴۰ بیمار (۱۵ زن و ۲۵ مرد) با متوسط سن ۴۵ سال که تشخیص گاستریت (۳۰ مورد) و کارسینوما (۱۰ مورد) برای آنها گزارش شده بود از قابل آسیب‌شناسی بیمارستان خاتم الانبیاء زاهدان و نمازی شیراز در فاصله سالهای ۸۰-۷۰ انتخاب شدند. در صورت تائید مجدد تشخیص قبلی، از بلوکهای پارافینی بیماران فوق مقاطعی با ضخامت ۵-۳ میکرومتر تهیه و با روش NOR و H-E رنگ‌آمیزی شد. در هر لام تعداد ذرات NOR ۵۰ سلول به صورت تصادفی توسط دو نفر و به صورت دو سوکور به کمک فلش نوری میکروسکوپ استاد - دانشجو Nikon(Opthiphot2) با ابژکتیو ۱۰۰ و روغن سدر شمارش شد. سپس شاخصهای آماری پراکندگی و تمایل مرکزی و همچنین تستهای آماری همبستگی Spermann و Mann-Whitney به کمک نرم‌افزار آماری SPSS(Ver.9) تعیین گردید.

* روش رنگ‌آمیزی

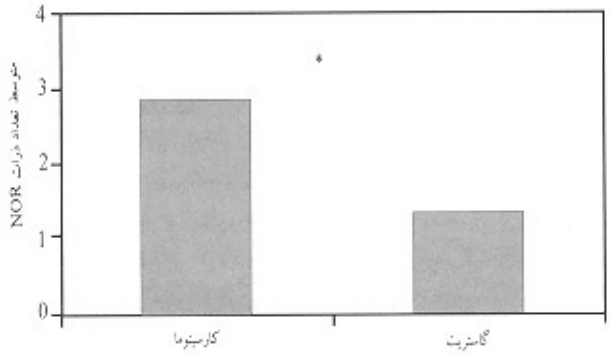
مقاطع پس از پارافین زدائی و آبدهی به روش معمول در آسیب‌شناسی، با محلول کار نیترات نقره کلوئیدی به مدت ۹۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه (۲۴-۲۰) و در تاریکی با روش Crocker (۱۹۸۹) رنگ‌آمیزی شد. در این روش دو حجم از محلول ۵۰gr/dl نیترات نقره با یک حجم از محلول ۲ درصد ژلاتین خوراکی در ۱درصد اسیدفرمیک بلافاصله قبل از مصرف با هم مخلوط گردید. برای ساخت تمام محلولها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. پس از اتمام واکنش رنگ‌آمیزی، مقاطع به مدت دو دقیقه در آب مقطر دیونیزه شستشو داده شد و سپس در محلول ۵ درصد تیوسولفات سدیم قرار گرفت. آن گاه با روش معمول آسیب‌شناسی آبگیری، شفاف و چسبانده شدند (۳). فتومیکروگرافهای لازم با میکروسکوپ تحقیقاتی Axiphoto Zeiss تهیه گردید.

یافته‌ها

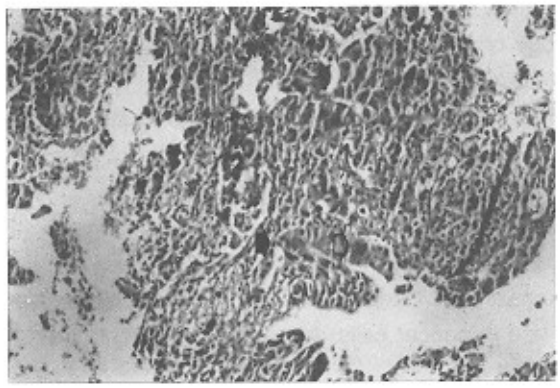
متوسط تعداد ذرات NOR و انحراف معیار برای گاستریت و کارسینوما به ترتیب برابر $X=۱/۳۹\pm۰/۱۵$ و $X=۲/۸۷\pm۰/۶۹$ بود. بیشترین تعداد سلولها در گاستریت تنها ۱ ذره NOR و که در کارسینوما بیشترین تعداد سلولها ۳ ذره NOR از خود نشان می‌دادند. تست همبستگی Spermann هماهنگی زیادی را میان دو نفر شمارش کننده برای NOR نشان داد ($P<0.001$ ،$r=۰/۹۷$) همچنین تست آماری Mann-Whitney اختلاف معناداری را ($P<0.001$) میان تعداد ذرات NOR برای گاستریت و کارسینوما نشان داد (نمودار و جدول ۱).

جدول ۱: شاخصهای آماری مربوط به بیماران گاستریت و کارسینوما در رنگ‌آمیزی NOR

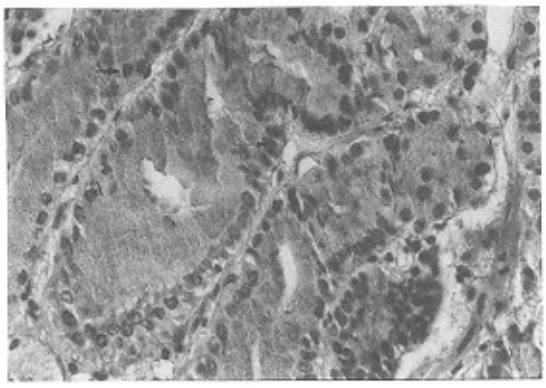
نوع ضایعه / شاخص آماری	متوسط و انحراف معیار	دامنه تغییرات	ضریب تغییرات	ماکزیمم تعداد ذرات در سلول	مینیمم تعداد ذرات در سلول
گاستریت	۱/۲۹ ± ۰/۱۵	۲	۰/۱	۲	۱
کارسینوما	۲/۸۷ ± ۰/۶۹	۵	۰/۲۴	۶	۱



نمودار ۱: مقایسه تعداد ذرات NOR در گاستریت و کارسینومای معده
* اختلاف معنادار گاستریت و کارسینوما را نشان می‌دهد ($P<0/001$)

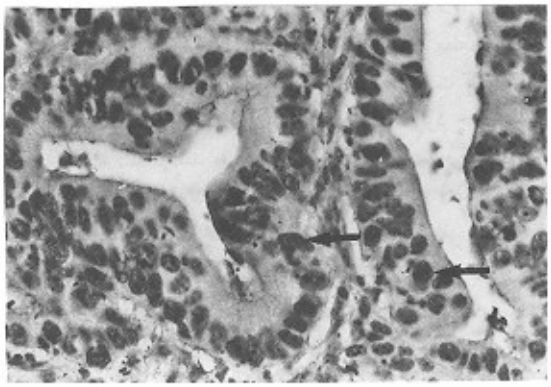


شکل ۱: به هم ریختگی شدید سلولی ← در کارسینومای با تمایز ضعیف و هیپرکرومازی هسته‌ای ← نشان داده شده است. هماتوکسیلین و ائوزین ۲۰۰×



شکل ۲: ذرات NOR به صورت دانه‌های مدوری ← در رنگ‌آمیزی نیترات نقره کلوئیدی گاستریت نشان داده شده است. ۴۰۰×

الگوی پراکندگی و شکل ذرات NOR در گاستریت معمولاً فقط یک ذره کوچک در سلولها بود که به صورت بسیار ریزی در هسته سلول نمایان می‌شد ولی در سلولهای کارسینومائی تعداد و شکل ذرات فوق‌العاده متغیر و متنوع بود، به طوری که بعضی سلولها چندین ذره کوچک و پراکنده در سر تا سر هسته سلول داشتند و بعضی دیگر یک ذره بسیار درشت در هسته سلول از خود نشان می‌دادند. این پراکندگی مورفولوژیک هستکی در موارد گاستریت مشاهده نشد (شکلهای ۳-۱).



شکل ۳: ذرات NOR به صورت دانه‌های هتروژنی ← با اندازه‌های مختلف در کارسینومای معده نشان داده شده است. ۲۰۰×

بحث

مقایسه اطلاعات آماری حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که متوسط تعداد ذرات NOR، انحراف معیار، ضریب تغییرات و دامنه تغییرات برای بیماران کارسینومائی به مراتب از بیماران گاستریتی بیشتر است. همچنین اکثریت سلولها در بیماران مبتلا به گاستریت (گروه مد آماری) تنها یک ذره NOR از خود نشان دادند. اما در کارسینوما (گروه مد آماری) ۳ ذره NOR کوچک درون هسته از خود نشان دادند. این یافته‌های آماری نشان دهنده تعداد ذرات و پراکندگی بیشتر آنها در گروه کارسینوما نسبت به گروه گاستریت است. تست آماری Mann-Whitney اختلاف میان این دو گروه را معنادار نشان داد. ($P<0.001$). مطالعات Piffko و همکاران در سال ۱۹۹۷ در مورد کارسینوم سلولها سنگفرشی دهان نشان داده است که افزایش تعداد NOR می‌تواند شاخص قابل اعتمادی در هیستوپاتولوژی برای ضایعات بدخیم باشد (۱۰). مطالعه Irazusta و همکاران در سال ۱۹۹۷ با استفاده از تستهای ناپارامتری در معده نیز اختلاف معناداری را از نظر تعداد ذرات NOR بین گروههای نرمال و سرطانی نشان داده است. اما الگوی هتروژن وجود این ذرات را به عنوان یک پارامتر قابل اعتماد در ضایعات معده مورد تاکید قرار داده است (۱۳). از طرف دیگر Kakeji و همکاران در سال ۱۹۹۶ ضمن تاکید بر رنگ‌آمیزی NOR به عنوان یک روش اقتصادی قابل قبول در سرطان معده نشان داده‌اند که این تکنیک می‌تواند اهمیت زیادی در پیش‌بینی رفتارهای سلولهای تومورال داشته باشد. لذا بیمارانی که سلولهایی با NOR بالا دارند بقای عمر ۵ ساله آنها نیز کمتر است و بر عکس بیمارانی که سلولهای با NOR کمتری دارند بقای عمر بهتری نیز دارند. بدین ترتیب شمارش تعداد ذرات NOR در معده نه تنها اهمیت پروگنوستیک دارد، بلکه می‌تواند برای تعیین پروتکل درمان بیماران نیز مفید بوده (۷) و علاوه بر آن بیانگر تغییرات ژنی سلول برای ژنهای کد کننده تعیین پروتئینهای

هستکی و ریبوزومهای سلولی نیز باشد.

مطالعات Bockmuhl و همکاران در سال ۱۹۹۱ در سرطان پستان نشان داده است که این رنگ‌آمیزی می‌تواند در ۹۵درصد موارد سلولهای سرطانی که قابلیت متاستاز به عقده‌های لنفاوی دارند را نشان دهد. بدین ترتیب ارتباط میان قابلیت متاستاز و ذرات NOR نشان داده می‌شود (۱۴). نتیجه تست همبستگی Spermann برای شمارش ذرات NOR در سلولها نیز امیدوارکننده است چراکه همبستگی بالائی را بین افراد شمارش کننده نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان ادعاکرد نتیجه این تکنیک برای شمارش ذرات، مستقل از افراد است. مطالعه Tahlan و همکاران در سال ۲۰۰۰ در این ارتباط بیانگر آن است که رنگ‌آمیزی می‌تواند در تعیین درجهٔ تومورها و تشخیص مورد خوش خیم از بد خیم کمک کننده باشد و عنوان می‌دارد که اندازه‌گیری ضریب تغییرات و Interobserver Variation در تکنیک NOR با اهمیت است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر با مطالعه فوق هم‌خوانی دارد. همچنین تغییر در شکل و الگوی پراکندگی ذرات NOR و وجود نوعی هتروژنیته برای این ذرات قبلاً توسط Cortes و همکاران در سال ۲۰۰۱ در سرطان سرویکس نیز عنوان شد (۱۵). در مطالعه حاضر نیز این هتروژنیته برای سلولهای کارسینومایی معده کاملاً مشخص بود در حالی که این هتروژنیته برای گاستریت ملاحظه نشد (۱۶). این موضوع نیز با مطالعه Irazusta و همکاران در سال ۱۹۹۸ هم‌خوانی دارد.

به هم خوردن نظم حاکم بر تقسیم سلولی یکی از ویژگیهای اصلی تومورها است که نوعی اختلاف درونی نیز میان انواع مختلف تومورها وجود دارد (۱۰). به نظر می‌رسد علی رغم توانائی این رنگ‌آمیزی در نشان دادن فعالیتهای پرولیفراتیو سلولی جهت استاندارد کردن آن به عنوان یک روش روتین هیستوپاتولوژی ضروری است که مطالعات بیشتری انجام گیرد. احتمال می‌رود که این تکنیک به عنوان روشی سریع در تشخیص به موقع ضایعات پیش سرطانی مورد توجه واقع شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان که حمایت مالی این طرح پژوهشی را عهده‌دار بود تشکر نمایند (طرح شماره ۱۶۷؛ ۷۸/۱۲/۱۹). همچنین از همکاریهای آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم تشریحی، پرسنل کتابخانه مرکزی، آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی زاهدان، همکاریهای بخش آسیب‌شناسی بیمارستان خاتم‌الانبیا زاهدان و جناب آقای مهندس حیدری (آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه زابل) تشکر می‌گردد.

References

1. Faivre J, Benhamiche AM:, Epidemiology and etiology of malignant gastrictumors. Rev Pract 1997; 47: 833-39

2. Ming Sc: Tumor of the esophagus and stomach. Suppl. Armed forces Interntinal pathol Washington DC 1985; 21-55

3. Crocker J: Nucleolar organizer regions. Current topics in pathology. 1990; 82: 91-150

4. Derenzini M, Teree D, Pession A: Nucleolar function and size in cancer cells. Am J Pathol 1998; 152(5): 1291-97

5. Antonagelo L, Bernardi FD, Capelozzi VL: Morphometric evaluation of argyrophilic organizer region is useful in predicting long term survival squmous cell carcinoma of the lung. Chest 1996; 111(1): 110-114

6. Risio M, Rossine FP: Cell proliferation in colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Anticancer Res 1993; 13(1) 43-47

7. Kakeji Y, Mehara Y, Orita H: Argyrophilic Nucleolar organizer region in ednoscopically obtained biopsy tissue: a useful predictor of nodal metastasis and prognosis in carcinoma of the stomach. J Am Cell Surg 1996; 162(6): 482-4787

8. Jain R, Malhorta V, Kumar N, Sarin SK: Nucleolar organizer regions in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Trop Gastroentrol 1998; 19(3): 100-101

9. Guski H, Hufnag P: Ag NOR analysis of atypical ductal hyperplasia and interductal carcinoma of the breast. Anal Quant Cytol Histol 2000; 22(3): 206-212

10. Piffko J, Bankfalvi A, Ner D: Standardized Ag NOR analysis of the invasive tumor front in oral squamous cell carcinomas. J Pathol 1997; 182: 450-456

۱۱. عرب محمدرضا، الطریحی تقی، شریعت شمس: مطالعه دیسپلازی معده با رنگ‌آمیزی اختصاصی NOR به روش کمکی. مجله حکیم ۱۳۷۹؛ سال ۳ و ۴، ۳۳۴-۳۲۸

۱۲. سلیمانی‌راد جعفر، تلقینی شهلا، بصیری محسن: ارزش تشخیصی نواحی سازمان دهنده هستکی در ضایعات توموری پروستات. مجله دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۱۳۷۸؛ ۵۸-۵۰

13. Irazusta SP, Vassallo J, Magna LA, Metze K, Trevisan M: The value of PCNA andAgNOR staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa. Pathol Res Pract 1998; 194(1): 33-39

14. Bockmuhl U, Theissig F, Dimmer V, Kunze KD: The impact of Nucleolar organizer regions for the lymph node spread and prognosis of invasive ductal carcinoma. Pathol Res Pract 1991 187(4): 437-443

15. Tahlan A, Nijhawan F, Joshi K: Grading of ductalbreast carcinoma by cytomorphometry and image morphometry with histologic correlation. Anal Cytol Histol 2000; 22(3) : 193-198

16. Cortes-Gutierrez EI, Leal-Elizondo L, Cerda-Flores FM: Polymorphism of Ag. NOR in cervical smears from women with cervical cancer. Anal Quant Cytol Cytol Histol 2001; 23(1): 9-14