

مجله دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

دوره ۶۳، شماره ۶، صفحات ۵۰۱ تا ۵۰۷، (سال ۱۳۸۴)

ارزیابی رنگ آمیزی AgNOR در پیشگویی رفتار

بالینی منژیومای سیستم عصبی مرکزی

بیمارستان سینا، ۸۱-۱۳۷۶

دکتر سید علی احمدی (استادیار)، دکتر نسرین صمدی (رزیدنت)

بخش پاتولوژی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: تعداد نقاط AgNOR (Argyrophilic nucleolar organizer regions) با فعالیت رشد سلولی مطابقت دارد. در این مطالعه قابلیت عود و پتانسیل بدخیمی منژیوما را با شمارش نقاط AgNOR در هسته مقایسه نموده ایم.

مواد و روشها: ابتدا کلیه موارد منژیوما در بیمارستان سینا طی سالهای ۱۳۷۶-۱۳۸۱ مورد بررسی قرار گرفته، درجه بندی آنها با روش سازمان بهداشت جهانی و محمود مجدداً تعیین شد. سپس ۸۱ نمونه شامل ۱۴ منژیوم خوشخیم کرانیال اولیه فاقد عود (تا پایان سال ۱۳۸۲)، ۱۴ منژیوم خوشخیم کرانیال اولیه دارای عود، نمونه عود آنها، ۱۴ آتیپیک، ۱۱ بدخیم و ۱۴ اسپینال انتخاب شدند. در کلیه آنها رنگ آمیزی AgNOR انجام شد و میانگین، میانه و انحراف معیار نقاط در آنها تعیین شد.

یافته‌ها: میزان نقاط AgNOR متناسب با گرید افزایش نشان میداد، اختلاف معنی داری بین منژیوم خوشخیم با آتیپیک و بدخیم ($p < 0/0001$) و نیز بین منژیوم خوشخیم کرانیال بدون عود و دارای عود ($p < 0/0001$) وجود داشت، اما فرم آتیپیک و بدخیم، کرانیال و اسپینال و نیز انواع اولیه و عود آنها باهم اختلاف معنی داری نداشتند. متوسط تعداد AgNOR کمتر از ۲/۳ با اختصاصیت ۹۳٪ تومورهای خوشخیم را از انواع آتیپیک و بدخیم جدا می‌نماید. همچنین در ۹۳٪ از تومورهای دارای نمای بافت شناسی خوشخیم در صورتی که متوسط نقاط AgNOR کمتر از ۱/۸ باشد قابلیت عود ندارند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: باتوجه به نتایج بدست آمده بنظر میرسد میزان AgNOR با گرید و قابلیت عود تومور ارتباط دارد و ممکن است در پیشگویی رفتار بالینی منژیوم مفید باشد.

کلمات کلیدی: AgNOR، منژیوما، منژیوم خوشخیم، کرانیال.

مقدمه

فاز G_1 افزایش یافته و در پایان فاز S به حد ماکزیمم میرسد. بنابراین تعداد و سایز AgNOR در هسته بر طبق سرعت تقسیم سلولی (doubling time) و مدت زمان سیکل سلول متغیر است (۸،۹).

اهداف این مطالعه شامل: ۱- ارزیابی ارتباط بین گرید مننژیوما و شمارش نقاط AgNOR بخصوص در جدا کردن انواع خوشخیم و بدخیم از یکدیگر ۲- بررسی ارزش AgNOR در تعیین قابلیت عود تومور ۳- مقایسه پتانسیل رشد مننژیومهای داخل جمجمه و نخاع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تحلیلی مقطعی (cross sectional) و گذشته‌نگر می‌باشد. ابتدا کلیه موارد مننژیوم سیستم عصبی مرکزی که در طی سالهای ۱۳۸۱-۱۳۷۶ در بیمارستان سینا تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، شامل ۲۳۸ نمونه بررسی قرار گرفت و با سیستم طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۰ (۴،۱۰،۱۱) گرید آنها مشخص شد. در ضمن همانژیوپرسیستوما مننژیوم از گروه بیماران کنار گذاشته شد. در مورد هر بیمار اطلاعات بالینی از جمله سن، جنس، محل درگیری، وسعت برداشت توسط جراحی و تاریخچه عود تا پایان سال ۱۳۸۲ با استفاده از پرونده بستری استخراج گردید. بیماران دارای اطلاعات ناکافی یا شک به کامل بودن برداشت جراحی از مطالعه حذف گردیدند. سپس از بین ۲۳۸ نمونه ارزیابی شده، تعداد ۸۱ بیمار انتخاب شد که شامل: (از این به بعد تحت عنوان گروه ۱ الی ۶ نامیده خواهند شد).

گروه ۱ - بیماران دارای مننژیوم خوش خیم اولیه داخل مغزی که در مدت فوق عود نداشتند (شامل ۱۴ نمونه که به صورت تصادفی از بین موارد موجود انتخاب شد).

گروه ۲- موارد مننژیوم‌های خوش خیم اولیه داخل مغزی که در این مدت عود کرده بودند (شامل ۱۴ نمونه).

گروه ۳- موارد عود گروه قبلی.

گروه ۴- مننژیوم آتیبیک داخل مغزی (شامل ۱۴ بیمار).

گروه ۵- مننژیوم بدخیم داخل مغزی (شامل ۱۱ نمونه).

مننژیوما شایعترین تومور اولیه غیرگلیال دستگاه عصبی مرکزی است (۱). این تومور معمولاً خوشخیم بوده و تمایل زیادی به درگیری بافت مغز ندارد و میتواند با برداشت کامل توسط جراحی درمان شود (۲). اما عود آن تحت تاثیر عواملی چون محل تومور، تهاجم عصبی یا عروقی، میزان برداشت تومور توسط عمل جراحی و پتانسیل رشد قرار دارد و میزان آن در بررسی‌های مختلف ۹ الی ۲۲٪ بیان شده است (۳). بندرت آنها واضحاً بدخیم بوده و منجر به متاستاز می‌شوند (۴). ارتباط بین نمای بافت شناسی و رفتار بالینی مننژیوما بدرستی مشخص نمیشد چرا که مواردی از مننژیوما با نمای بافت شناسی کاملاً خوشخیم میتوانند پس از برداشت کامل توسط جراحی عود نمایند. ارزیابی اندکسهای رشد میتواند به بافت شناسی معمول در پیشگویی عود و تعیین سرنوشت بیمار کمک نماید. در سال ۱۹۹۷ مواردی از مننژیوما تحت عنوان مننژیومهای خوشخیم دارای رشد سریع شناسایی شدند که از نظر بافت شناسی از انواع خوشخیم غیر راجعه غیر قابل شناسایی هستند (۵). ولی اندکسهای پرولیفراتیو بالاتری دارند که با متدهای مختلف ارزیابی کیتیک سلولی شامل تعیین میزان DNA با استفاده از فلوسیتومتری، اندکس نشاندارشدن با (PCNA (proliferating cell nuclear antigen) و BudR (5-bromodexyuridine) Ki-67 و (NOR) Nucleolar organizer region سگمانهایی از کروموزومها بوده، که محتوی ژنهای کد کننده ریبوزومی می‌باشد و بر روی بازوی کوتاه کروموزومهای ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ متمرکز هستند.

همراه آنها گروهی از پروتئینهای اسیدی غیر هیستونی که تمایل به باند شدن به نقره دارند نیز در این محل قرار دارند. میزان این پروتئینها در نمونه‌های سیتوهیستولوژیک از اوائل

جدول شماره ۱- میانگین سنی و جنسی گروههای مورد مطالعه

شماره گروه	سن و جنس	گروه	میانگین سن	دامنه سن	تعداد مرد	تعداد زن	تعداد کل
گروه ۱		اولیه فاقد عود	۵۲	۲۹-۶۸	۴	۱۰	۱۴
گروه ۲		اولیه دارای عود	۴۱/۱۴	۱۶-۵۶	۶	۸	۱۴
گروه ۳		راجعه	۴۷/۹۳	۲۲-۵۵	۶	۸	۱۴
گروه ۴		آنتیبیک	۴۱/۴۳	۱۳-۷۲	۱۰	۴	۱۴
گروه ۵		بدخیم	۵۱/۲۷	۷۶-۶۵	۹	۲	۱۱
گروه ۶		اسپاینال	۴۹/۰۷	۱۳-۷۶	۷	۷	۱۴

در مناطق دارای بیشترین درجه آنتیپی سلولی انجام شد هر نمونه بصورت مستقل توسط دو نویسنده مقاله ارزیابی شده و میزان اختلاف بین این ۲ شمارش کمتر از ۵٪ بود. سپس میانگین، حداقل و حداکثر نقاط AgNOR در هر نمونه و همچنین میانگین، میانه و انحراف معیار تعداد نقاط را در هر گروه محاسبه و ثبت گردید.

در بررسی آماری با استفاده از روشهای آنالیز آماری غیر پارامتریک Kruskal-Wallis test و Mann-Whitney test توزیع نقاط در گروههای مختلف با هم مقایسه شده و P value کمتر از ۰/۰۵ ارزشمند تلقی شد.

گروه ۶- مننژیوم نخاعی خوش خیم (شامل ۱۴ مورد). سپس بلوک مناسب از هر کدام انتخاب گردید و با متد Ploton (۱۹۸۶) (۱۲) رنگ آمیزی شد. بررسی میکروسکوپی بدون اطلاع از نوع مننژیوم، در فیلههای متعدد در هر لام با بزرگنمایی ۱۰۰۰× با روغن ایمرسیون بعمل آمد. تعداد نقاط رنگ آمیزی شده در هسته حد اقل ۲۰۰ سلول مننگوتلیال شمرده شد و هسته های فاقد نقاط AgNOR در محاسبه منظور نشدند (زیرا این نقاط در سلولهای در حال مرگ محو می شوند). در تومورهای غیریکنواخت مانند بعضی از انواع مننژیوم آتیپیکال شمارش

جدول شماره ۲ - مقایسه ارتباطات دو به دو گروههای مورد مطالعه، میزان U Mann-Whitney و P value در موارد وجود رابطه

اسپاینال (گروه ۶)	کراتینال					مقایسه دو به دو بین گروهها
	گروه ۵	گروه ۴	گروه ۳	گروه ۲	گروه ۱	
NS	U=۹ p<۰/۰۰۰۱	U=۱۹/۵ p<۰/۰۰۰۱	---	U=۲۳ p<۰/۰۰۰۱	---	گروه ۱ کراتینال
---	U=۴۰ p<۰/۰۰۰۱	NS	NS	---	U=۲۳ p<۰/۰۰۰۱	گروه ۲
---	---	---	---	NS	---	گروه ۳
---	NS	---	---	NS	U=۱۹/۵ p<۰/۰۰۰۱	گروه ۴
---	---	NS	---	U=۴۰ p<۰/۰۰۰۱	U=۹ p<۰/۰۰۰۱	گروه ۵
---	---	---	---	---	NS	اسپاینال (گروه ۶)

شماره های ۱-۶ دلالت بر گروه مورد بررسی دارد

Mann-Whitney test=U بین گروهها

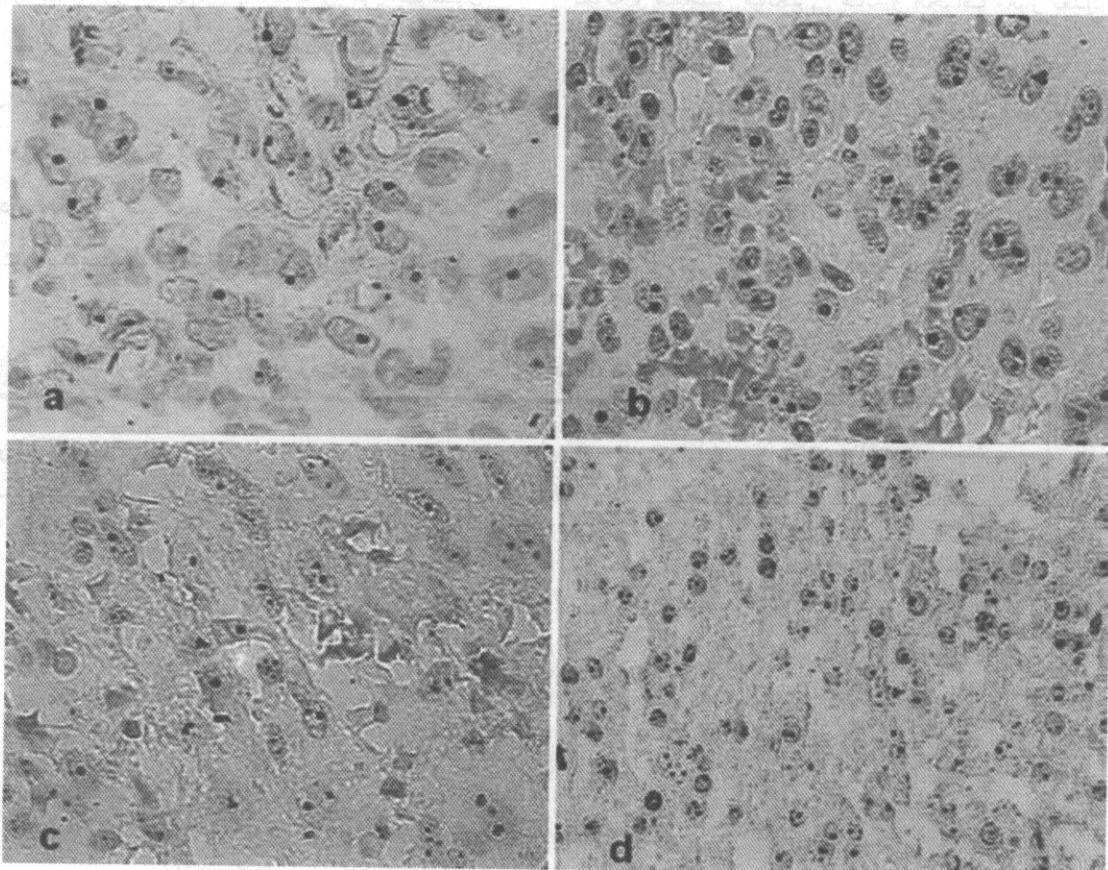
NS = عدم رابطه معنی دار

راجعه ۱/۳۷ (۰/۳۸)، انواع راجعه ۱/۸۷ (۰/۳۸)، اتیپیک ۲/۰۱ (۰/۳۶)، بدخیم ۲/۳۹ (۰/۷۴) و نمونه‌های داخل نخاعی ۱/۲۴ (۰/۱۴) بودند (شکل ۱).

افزایش تعداد نقاط AgNOR از خوشخیم به اتیپیک و بدخیم مشاهده می‌شود. اگرچه اختلاف بین انواع خوشخیم با اتیپیک و بدخیم معنی دار بود (P در هر دو کمتر از ۰/۰۰۰۱) اما تفاوت معنی داری بین انواع بدخیم و اتیپیک وجود نداشت. به مقایسه اختلاف تعداد نقاط AgNOR در هر یک از گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از Mann-Whitney test در جدول شماره ۲ دقت نمایید.

یافته‌ها

میانگین سنی گروه مورد مطالعه ۴۶/۹۹ (۱۳ تا ۷۶ سال) میباشد و از نظر جنسی ۴۲ نمونه متعلق به جنس مذکر و ۳۹ نمونه متعلق به جنس مونث میباشد. در ضمن در موارد اتیپیک و بدخیم فراوانی در جنس مذکر بیشتر است پراکنندگی سنی و جنسی هر کدام از گروه‌های مورد مطالعه بر طبق جدول شماره ۱ می‌باشد. در همه نمونه‌ها نقاط واضح رنگ شده توسط نقره در هسته ۲۰۰ سلول شمرده شد. در انواع خوشخیم غیر راجعه بیشتر هسته‌ها فقط یک نقطه AgNOR بزرگ داشتند ولی در سایر گروه‌ها با افزایش گرید تومور افزایشی در تعداد نقاط در هسته همراه کاهش پیشرونده سایز آنها مشهود بود. میانگین و انحراف معیار انواع خوشخیم غیر



شکل شماره ۱- نمای رنگ آمیزی AgNOR با درشت نمایی $\times 1000$: **a**: مننژیوم خوشخیم کرانیال اولیه فاقد عود **b**: مننژیوم خوشخیم کرانیال **c**: مننژیوم اتیپیک (از نوع chordoid) **d**: مننژیوم بدخیم (از نوع سلول کوچک) در تعداد زیادی از سلولها ۲ یا بیشتر نقطه AgNOR وجود دارد

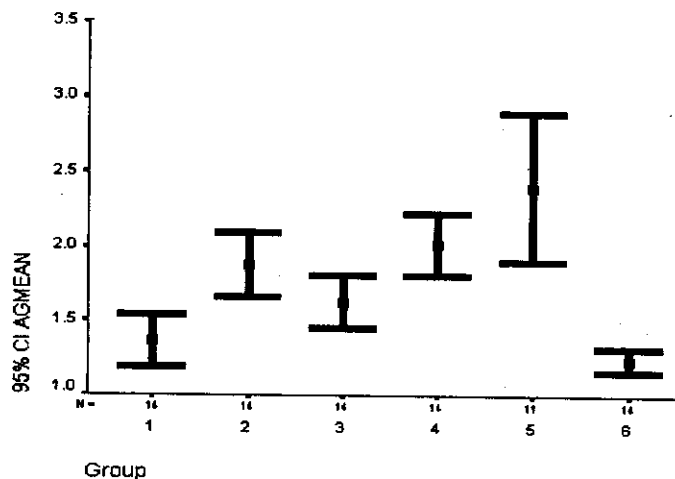
بحث

۹۳٪ و ۶۷٪ از هم جدا نماییم. همچنین مشخص شد که وجود هسته هایی با تعداد نقاط AgNOR بیش از ۶ میتواند مننژیوم خوشخیم را از بدخیم و اتیبیک با حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب ۴۵٪، ۹۹٪ و ۹۲٪ جدا نماید.

در مطالعه اخیر همانند بررسی Capelle^(۱۵) و Scarpelli^(۱۶) رابطه مثبت قوی بین شمارش میزان AgNOR و پتانسیل عود وجود دارد. در حالیکه Orita^(۱۷) نتوانست چنین رابطه ای را نشان دهد که شاید بعلت تفاوت بارز حجم نمونه های دو گروه مورد مطالعه باشد.

بعنوان معیاری برای تخمین پتانسیل عود در مننژیومها با استفاده از منحنی ROC (receiver operating characteristics) میانگین ۱/۸ را بعنوان cut off برای افتراق انواع دارای پتانسیل عود بالاتر و انواع فاقد عود در مدت مطالعه تعیین نمودیم. که حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت این تست به ترتیب مساوی ۶۰٪، ۹۳٪ و ۸۲٪ میباشد. در ضمن مننژیوم های غیر راجعه بندرت دارای هسته هایی با تعداد AgNOR مساوی یا بیشتر از ۴ می باشند (حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب مساوی ۸۰٪، ۸۸٪ و ۹۲٪ می باشد).

اگر چه شمارش نقاط AgNOR از اولین متدهای مورد استفاده در بررسی رشد سلولی است و تحت اثر تفاوت های تکنیکی قرار میگیرد اما هنوز هم با ارزش است. PCNA، BudR و Ki-67 درصد سلول های در حال رشد را نشان می دهند ولی سرعت رشد واقعی نه فقط وابسته به درصد سلول های در حال رشد است بلکه مدت زمان سیکل سلولی که توسط AgNOR میتواند تعیین شود نیز از عوامل مهم می باشد (۱۳، ۱۴). علاوه بر این بعنوان یک روش کمکی در بررسی با روش های بافت شناسی معمول AgNOR هنوز هم ساده ترین و ارزاترین متد قابل انجام بر روی برش های پارافینه بوده قابل انجام در هر آزمایشگاهی میباشد. همانطور که قبلا توسط Maier (۱) و Capelle (۱۵) بیان شده بود در این مطالعه نیز شمارش AgNOR با گرید تومور ارتباط داشت. اگر چه بین مقادیر بدست آمده برای گروه های مختلف بخصوص انواع اتیبیک و بدخیم تا حدی هم پوشانی وجود داشت (نمودار ۱) که می تواند بعلت اندکسهای بالای رشد هر دو تومور باشد. با استفاده از منحنی ROC () receiver operating characteristics و بدست آوردن نقطه cut off معادل ۲/۳ برای شمارش AgNOR بین گروه های خوشخیم با بدخیم و اتیبیک میتوانیم این گروه ها را با حساسیت، اختصاصیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب ۳۲٪



نمودار شماره ۱- مقایسه میزان AgNOR بین گروه های مورد بررسی

نداشت. ولی مطالعات دقیق‌تر با حجم جمعیت بیشتر برای تایید این مسئله لازم است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه پیشنهاد مینماید که ارزیابی مارکرهای رشد سلولی از جمله AgNOR همراه روشهای مرسوم بافت شناسی میتواند به ارزیابی بهتر بافت‌شناسی و پیشگویی رفتار بالینی تومورها حتی اگر ظاهر بافت شناسی آنها خوشخیم باشد کمک نماید.

در این مطالعه مشابه بررسی De Stefano (۱۷) و Maier (۱) فاوتی بین تومورهای اولیه و عود آنها وجود نداشت که نشان می‌دهد که از ابتدا پتانسیل عود در این گروه وجود داشته است. میزان AgNOR مننژیوم‌های خوشخیم راجعه با انواع بدخیم تفاوت معنی‌داری داشت اما با مننژیوم اتیپیک نداشت که مشابه مطالعه Kudoh (۵) با سایر اندکسهای رشد میباشد. این امر احتمالاً نشانه ارتباط نزدیک اندکسهای پرولیفراتیو و رفتار بالینی تومور می باشد که الزاما با نمای بافت شناسی مطابقت ندارد..

در این مطالعه برخلاف بررسی Arumi (۱۸) تفاوتی بین مننژیومهای خوشخیم داخل جمجمه و داخل نخاعی وجود

منابع

1. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance, J. Neurosurg, 1992,77:616-623.
2. Rosenblum M K, Bilbao JM, Ang LC. Neuromuscular System: Meningiomas In Rosai & Ackerman's surgical pathology. Volume 1. 9th edition. Edited by Rosai J. Philadelphia: Mosby; 2004: 2564-2572.
3. Akeyson EW, Mccutcheon IE. management of benign and aggressive intracranial meningiomas. Oncol 1996 May; 10(5):747-759.
4. Burger P, Scheihauer BW, Vogel FC. Intracranial meninges, In: Surgical pathology of nervous system and its coverings. 4th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2002.p: 49-71.
5. Kudoh CH, Detta A, Yeh J, Jackowski A, Hitchcock ER, Yoshimizu N et al. Rapidly growing benign meningiomas; correlation with clinical features and histological diagnosis. Clinic neurol and neurosurg 1997 July; 99, suppl 1:s239.
6. Orita T., Kajiwaru K, Nishizaki T, Ikeda N, Kamiryo T, Aoki H. Nucleolar organizer region in meningioma, Neurosurg. 1990,21(1), 43-45.
7. Ferraraccio F, Accardo M, Giangaspero F, Cuccurullo L. Recurent and atypical meningiomas – a multiparametric study using Ki-67 labelling index , AgNOR and DNA

- Feulgen staining: Clin Neuropathol 2003; 22 (4): 187-192.
8. Derenzini M. The AgNORs. Micron 2000; 31: 117-120.
9. Derenzini M, Trere D, Chieco P, Melchiorri C. Interphase AgNOR is not related to DNA content in 11 established human cancer line. Exp Cell Res 1994; 211: 282-285.
10. Perry A, Scheithauer B, Stafford S, Lohse CM, Wollan PC. Malignancy in meningiomas a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications, Cancer 1999; 85:2046-2056.
11. Perry A, Stafford S, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse C. Meningioma grading: an analysis of histopathologic parameters. Am J Surg Pathol ; 1997 ,21 (12) :1445-1465.
12. Ellis I. Assessment of prognosis in practice .In: Bancroft J, Gamble M (editors) theory and practice of histopathological techniques ,5th ed,UK:Churchill livingstone ,2002 .p:506.
13. Brugal G. Interpretation of Ki-67 / AgNOR proliferation markers, Anal Cell Pathol 1996; 10: 212 (abs).
14. Nakabayashi H, Sunada I, Hakuba A. Evaluation of proliferative activity of benign brain tumors using AgNOR X Ki-67, Clin Neurol Neurosurg 1997, supp 1, s228.
15. Capelle L, Kujas M, Sichez JP, Van Effenterre R, Faillo T, Arthuis F et al. Prognostic value of NORs counting method applied to meningiomas: correlation with radio-clinical data and follow up, anal Cell pathol 1996,10(2):224.
16. Scarpelli M, Montroni R, Sisti s, Maruzzi GM, Brancorsini D, Brancorsini D et al. quantitative evaluation of recurrent meningioma, Pathol Res pract 1989,185(5): 746-751.
17. De Stefano V, Salvatore G, Monticelli A, Riccio P, Cappabianca P, Bucciero A. Prognostic significance of Nucleolar organizer regions in meningiomas. , J Neurologic Sci .1996, 40(2), 89-92.
18. Arumi M, Aameda F, Galite E. Serrano S. Value of AgNORs in predicting behavior of meningioma. E J Pathol [serial on the Internet]. 1996 Dec, [cited 2002 Oct 19]; 2(4): 964-05 .Available from: URL: <http://ejpath.amu.edu.pl/EJP>