

رنگ‌آمیزی اگنور (AgNOR) اصلاح شده در تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی

آزاده اندیشه تدبیر*، محمد جواد اشرف**، محمد علی کتابی***

* استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز

** استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز

*** دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز

چکیده

بیان مساله: تومورهای غدد بزاقی دارای خصوصیات بافت شناختی و زیست شناختی متفاوت هستند و در برخی از موارد افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیمی‌هایی با درجه‌ی پایین مشکل است.

هدف: هدف این پژوهش، بررسی ارزش تشخیص رنگ آمیزی اگنور (AgNOR) اصلاح شده، در افتراق تومورهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی بود.

مواد و روش: در این بررسی مقطعی، 40 تومور خوش خیم (34 مورد پلئومورفیک آدنوما و 6 مورد تومور وارتنین)، 40 تومور بدخیم (26 مورد آدنوئید سیستیک کارسینوما و 14 عدد موکوپیدرموئید کارسینوما) و 10 مورد سیالادنیت مزمن غدد بزاقی با روش اگنور اصلاح شده رنگ‌آمیزی گردید، سپس، شمارش نقاط اگنور، تفاوت در اندازه و توزیع نقاط در تومورهای خوش خیم و بدخیم محاسبه و مقایسه شد و اطلاعات به دست آمده توسط آزمون‌های آنوا (ANOVA)، توکی (Tukey)، تی (t-test) و کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) واکاوی گردید.

یافته‌ها: میانگین شمارش نقاط اگنور در تومورهای خوش خیم $(1/29 \pm 0/13)$ ، کمتر از تومورهای بدخیم $(2/87 \pm 0/25)$ بود. پراکندگی اندازه و توزیع نقاط اگنور در تومورهای بدخیم در مقایسه با تومورهای خوش خیم بیشتر گزارش شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی کنونی نشان داد، که رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده روشی مفید برای افتراق تومورهای خوش خیم و بدخیم بزاقی از یکدیگر است، اما تفاوت در اندازه و توزیع نقاط نیز افزون بر شمارش نقاط باید مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اگنور اصلاح شده، پلئومورفیک آدنوما، تومور وارتنین، آدنوئید سیستیک کارسینوما، موکوپیدرموئید کارسینوما

درآمد

نواحی سازمان یافته‌ی هسته‌ای (NOR)، قطعاتی از کروموزوم هستند، که از روی آنها RNA ریبوزومی نسخه‌برداری می‌شود (3-1). این نواحی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های اکروستتربیک، 13، 14، 15، 21 و 22 قرار گرفته است و در مرحله‌ی اینترفاز درون هسته قابل مشاهده هستند (4).

NORS دارای شماری پروتئین‌های غیر هیستونی هستند، که تمایل زیادی به اتصال به نقره دارند و به صورت انتخابی با رنگ آمیزی اگنور رنگ گرفته و به صورت نقاط تیره درون هسته دیده می‌شوند (4 و 5). رنگ‌آمیزی اگنور روشی ساده و یک مرحله‌ای است، که بر روی بلوک‌های پارافینی نیز قابل انجام است (6). تفاوت در شمار، اندازه و شیوه‌ی گسترش نقاط رنگ رفته با این رنگ آمیزی، با تغییرات در فعالیت نسخه‌برداری همراه بوده (7 و 8). شمار نقاط اگنور با پلوئیدی سلول و میزان تکثیر سلولی مرتبط است (9). بررسی‌هایی با استفاده از این روش رنگ‌آمیزی بر روی تومورهای گوناگون مانند کارسینوم سلول سنگفرشی، لنفوم غیر هوچکین، کارسینوم سلول کلیوی و مالتیپل میلوم انجام گرفته است (10) و در بررسی‌های دیگر نیز اهمیت معیارهای نقاط اگنور (شمار، اندازه و پراکندگی نقاط) در آسیب‌شناسی تومور و خصوصیات تشخیصی و پروگنوزتیک کانسره‌های متفاوت، بررسی شده است (11-13).

در بررسی بخاری (Bukhari) و همکاران، روش رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده (Modified AgNOR) مطرح گردید و این رنگ‌آمیزی بر روی تومورهای مغزی انجام شد و برتری آن بر اگنور معمولی نشان داده شده است. این تکنیک روشی ساده و قابل انجام بر روی بافت‌های ثابت شده در پارافین و بیوپسی‌های کوچک است. در این روش در انتهای روند رنگ آمیزی از محلول کلرید طلا استفاده می‌شود و نقاط رنگ گرفته آشکارتر و مشخص تر می‌گردند (14).

تومورهای غدد بزاقی حدود 3/5 درصد از نئوپلاسم‌های سر و گردن را شامل می‌شوند (15 و 16). این تومورها دارای خصوصیات بافت شناختی و زیست شناختی متفاوت هستند (17) و خصوصیات بالینی آنها همیشه با درجه‌ی بافت شناختی ارتباط ندارد (18). از سویی، در برخی از موارد افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیمی‌هایی با درجه‌ی پایین مشکل بوده، به ویژه مواردی که اندازه‌ی نمونه‌ی بیوپسی شده کوچک است (19).

ادیمی (Adeyemi) و همکاران با استفاده از رنگ‌آمیزی اگنور معمولی نشان دادند، که این روش برای افتراق تومورهای خوش خیم از بدخیم بزاقی قابل استفاده است، اما برای افتراق درجه‌های گوناگون بدخیمی و پروگنوز آسیب‌های بدخیم قابل استفاده نیست (19).

اسلامی و همکاران، ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی نیترات نقره را در تومورهای سروگردن بررسی کردند. نتایج بررسی نشان داد، که این روش برای افتراق آسیب‌های دیسپلاستیک مخاطی از تومورهای بدخیم اپی تلیالی و نیز افتراق تومورهای خوش خیم غدد بزاقی از تومورهای بدخیم روشی سودمند است (20).

از آنجا که در بررسی‌های انجام شده مقایسه‌ای میان تومورهای خوش خیم و بدخیمی‌هایی با درجه‌ی پایین (که اصلی‌ترین دشواری تشخیصی در تومورهای بزاقی هستند) انجام نگرفته است، همچنین رنگ آمیزی اگنور اصلاح شده (که نقاط وضوح بیشتری دارند) بررسی نشده و اندازه و الگوی گسترش این نقاط که در آسیب‌شناسی تومور و خصوصیات تشخیصی اهمیت دارند، مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی ارزش کاربردی رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در تشخیص افتراقی تومورهای خوش خیم و بدخیم بزاقی بود.

مواد و روش

در این بررسی مقطعی با مراجعه به بایگانی بخش آسیب‌شناسی بیمارستان خلیلی طی سال‌های 1383 تا 1385 فهرست تومورهای خوش خیم و بدخیم غدد بزاقی استخراج شد و سپس لام‌های H&E آنها جهت تایید تشخیص توسط دو آسیب‌شناس بررسی گردید. با توجه به کافی بودن میزان بافت، داشتن سلولاریته مناسب و قطعی بودن تشخیص تومور بزاقی بر پایه‌ی معیار WHO (21)، 40 عدد تومور خوش خیم بزاقی شامل 34 مورد پلئومورفیک آدنوما (PA) و 6 مورد تومور وارتین (WT) و 40 عدد تومور بدخیم غدد بزاقی شامل 26 مورد آدنوئید سیستیک کارسینوما (ACC) و 14 عدد موکوپیدرموئید کارسینوما (MEC) و 10 عدد سیالادنیت مزمن به عنوان آسیب‌های غیر نئوپلاستیک انتخاب شدند. تومورهای ACC به انواع توبولار، غربالی و توپر (22) و تومورهای MEC به انواعی با درجه‌ی بدخیمی پایین، متوسط و بالا بخش گردیدند (22).

اطلاعات مربوط به بیماران شامل سن، جنس و جای آسیب

درجه بندی توزیع نقاط: 0: محدود به هستک، +1: به ندرت بیرون از هستک، +2: پراکندگی متوسط بیرون از هستک، +3: پراکندگی وسیع بیرون از هستک
برای مقایسه ی اعداد به دست آمده در سه گروه سیالانیت، تومورهای خوش خیم و بدخیم از آزمون آماری آنوا، برای مقایسه ی اعداد به دست آمده در گروه ها به صورت دو به دو از آزمون آماری توکی، برای مقایسه ی اعداد به دست آمده در انواع تومورهای ACC و MEC از آزمون آماری کروسکال-والیس و مقایسه ی اعداد در تومورهای خوش خیم و درجه های MEC از آزمون آماری تی استفاده شد.

یافته ها

در بررسی میکروسکوپی اسلایدها، نقاط اگنور در درون هسته به صورت نقاط قهوه ای تا سیاه رنگ و با حاشیه ی مشخص و کاملاً آشکار، قابل مشاهده بودند. میانگین شمارش اگنور در آسیب های التهابی $1/11 \pm 0/11$ (نگاره ی 1-الف) و در تومورهای خوش خیم و بدخیم به ترتیب $1/29 \pm 0/13$ و $2/87 \pm 0/25$ محاسبه گردید، که اختلاف میانگین اگنور در میان سه گروه آسیب ها تفاوت معنادار آماری نشان داد ($p < 0/05$) (جدول 1).
میانگین شمارش نقاط در PA $1/29 \pm 0/14$ ، در WT $1/29 \pm 0/12$ (نگاره های 1-ب، 1-پ) و در MEC و ACC به ترتیب $2/84 \pm 0/27$ و $2/91 \pm 0/32$ (نگاره های 1-ت، 1-ث) محاسبه شد. همان گونه که مشاهده می گردد، در آسیب های راکتیو و تومورهای خوش خیم، میانگین شمارش نقاط کمتر از 2 و در آسیب های بدخیم بیشتر از 2 است.

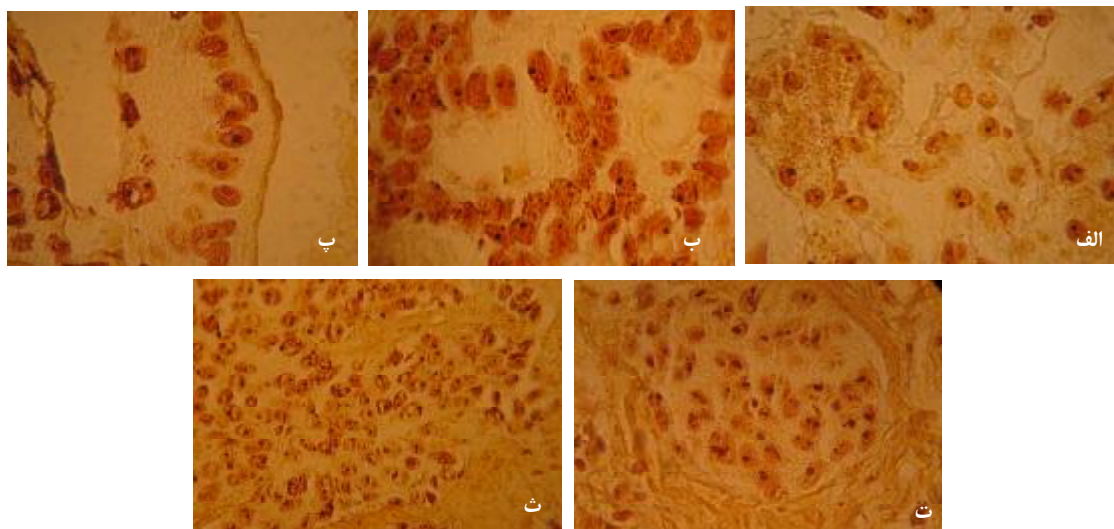
نمایه ی تکثیری نیز، در میان تومورهای خوش خیم و بدخیم تفاوت معنادار آماری نشان داد ($p < 0/05$)، اما در میان آسیب های التهابی و تومورهای خوش خیم تفاوت معنادار نداشت ($p > 0/05$) (جدول 1). نمایه ی تکثیری در PA $7/5 \pm 2/3$ درصد، در WT $5/5 \pm 3/4$ درصد و در MEC و ACC به ترتیب $40/85 \pm 12/7$ و $41/19 \pm 13/6$ درصد محاسبه شد.

از پرونده ی بالینی موجود در بخش آسیب شناسی استخراج و در برگه ی اطلاعاتی وارد گردید. پس از آماده سازی بلوک های پارافینه ی مربوط به هر لام، برش های 4 میکرونی از آنها فراهم و برای انجام رنگ آمیزی اگنور اصلاح شده آماده شدند⁽¹⁴⁾. نمونه ها در آغاز در زایلن پارافین گیری، سپس به وسیله ی الکل 95، 90 و 70 آب گیری شده و سپس در آب مقطر دهیدراته گردیدند. پس از آن بافت ها به مدت 5 دقیقه در اسید الکل (سه قسمت اتانول و دو قسمت اسید استیک) قرار گرفته و چندین مرتبه با آب مقطر شسته شدند. سپس لام ها در محلول نیترات نقره به مدت 38 دقیقه در محیطی تاریک و مرطوب در دمای 37 درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. محلول مورد استفاده شامل دو بخش محلول نیترات نقره 50 درصد و یک قسمت ژلاتین 2 درصد در اسید فرمیک 1 درصد است. از آب مقطر برای تهیه ی همه ی محلول ها استفاده گردید. سپس لام ها به مدت 5 دقیقه در محلول 1 درصد کلرید طلا قرار داده شد. پس از رنگ آمیزی، اسلایدها با آب مقطر شسته، توسط الکل و زایلن دهیدراته و در پایان مانع گردیدند. مقاطع رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 100 برابر عدسی شیئی با استفاده از روغن بررسی شدند. روش های شمارش نقاط رنگ گرفته در مقاله های گوناگون متفاوت است. در برخی مقاله ها نقاط روی هم قرار گرفته و نزدیک به هم یک نقطه به شمار می رود^(19 و 23)، در حالی که برخی مقاله ها این نقاط را به صورت جداگانه به شمار می آورند⁽²⁴⁾. در این بررسی، نقاط روی هم قرار گرفته و نزدیک به هم یک نقطه به شمار می رود. در هر لام سه ناحیه به صورت اتفاقی انتخاب شده و شمار نقاط در 100 سلول شمارش گردید و میانگین آنها محاسبه شد. سپس، درصد سلول هایی که دارای 5 عدد یا بیشتر گرانول درون هسته بودند، با عنوان نمایه ی تکثیری (Proliferative Index) محاسبه شد⁽¹⁴⁾. (P AgNOR). درجه بندی اندازه و توزیع نقاط بر پایه ی معیارهای زیر محاسبه گردید⁽²⁵⁾:

درجه بندی اندازه ی نقاط: 0: نقاط هم اندازه، +1: دو اندازه متفاوت، +2: سه اندازه متفاوت، +3: شامل همه ی اندازه ها

جدول 1: مقایسه ی میانگین شمارش نقاط، نمایه ی تکثیری، پراکندگی اندازه و توزیع نقاط در آسیب های گوناگون

گونه ی آسیب	میانگین شمارش اگنور	نمایه ی تکثیری (درصد)	پراکندگی اندازه نقاط	پراکندگی توزیع نقاط
سیالانیت مزمن	$1/11 \pm 0/11$	$4/5 \pm 0/97$	$0/5 \pm 0/2$	1 ± 0
تومورهای خوش خیم	$1/29 \pm 0/13$	$7/17 \pm 2/6$	$0/55 \pm 0/35$	$1 \pm 0/22$
تومورهای بدخیم	$2/87 \pm 0/25$	$41/07 \pm 13/5$	$1/95 \pm 0/22$	$2/47 \pm 0/5$



نگاره 1- الف: رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در سیالادنت مزمن **ب:** رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در PA **پ:** رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در تومور وارتنین **ت:** رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در موکوپیدرموئید کارسینوما **ث:** رنگ‌آمیزی اگنور اصلاح شده در آدنوئید سیستیک کارسینوما

تفاوت در اندازه‌ی نقاط در تومورهای بدخیم دیده شد (1/95 ± 0/22)، در حالی که در آسیب‌های التهابی و خوش خیم اندازه‌ی نقاط یکنواخت‌تر است (جدول 1). اختلاف پراکندگی اندازه‌ی نقاط در تومورهای بدخیم در مقایسه با آسیب‌های التهابی و خوش خیم از لحاظ آماری معنادار بود ($p < 0/05$)، اما در مورد آسیب‌های التهابی و خوش خیم اختلاف پراکندگی اندازه‌ی نقاط معنادار نیست ($p > 0/05$). میانگین توزیع نقاط در هسته در آسیب‌های التهابی و خوش خیم همانند بود ($p > 0/05$) اما در آسیب‌های بدخیم (2/47 ± 0/5) در مقایسه با آسیب‌های التهابی و خوش خیم اختلاف چشمگیر آماری نشان داد ($p < 0/05$) (جدول 1). میانگین شمارش نقاط در ACC (2/91) بیشتر از MEC (2/84) محاسبه شد ($p > 0/05$). مقایسه‌ی میانگین شمارش نقاط، نمایه‌ی تکثیری، پراکندگی

اندازه و توزیع نقاط در انواع تومورهای ACC و درجه‌های گوناگون MEC در جدول 2 آورده شده است. میانگین شمارش نقاط و نمایه‌ی تکثیری به ترتیب در MEC‌هایی با درجه‌ی پایین 2/67 و 41/8 درصد، موکوپیدرموئید کارسینوماهایی با درجه‌ی بدخیمی متوسط 2/92 و 50 درصد و در MEC‌های درجه‌ی بالا 3/1 و 59 درصد محاسبه شد. میانگین شمارش نقاط و نمایه‌ی تکثیری به ترتیب در ACC‌های نوع توبولار 2/55 و 24/4 درصد، در گونه‌ی غربالی 2/77 و 43/8 درصد و در گونه‌های توپر 3/1 و 47 درصد محاسبه شد. میانگین شمارش نقاط و نمایه‌ی تکثیری میان انواع ACC و درجه‌های گوناگون MEC اختلاف معنادار آماری نشان داد ($p < 0/05$). میانگین شمارش نقاط و نمایه‌ی تکثیری، پراکندگی اندازه و توزیع نقاط در میان تومورهای خوش خیم و درجه‌های پایین MEC اختلاف معنادار آماری داشت ($p < 0/05$).

جدول 2: مقایسه‌ی میانگین شمارش نقاط، نمایه‌ی تکثیری، پراکندگی اندازه و توزیع نقاط در گونه‌های آدنوئید سیستیک کارسینوما و درجه‌های هیستولوژیک موکوپیدرموئید کارسینوما

گونه‌ی آسیب	میانگین شمارش اگنور	نمایه‌ی تکثیری (درصد)	پراکندگی اندازه نقاط	پراکندگی توزیع نقاط
آدنوئیدسیستیک کارسینوما				
توبولار	2/55 ± 0/09	24/4 ± 4/15	1/8 ± 0/44	2/4 ± 0/54
غربالی	2/77 ± 0/13	42/25 ± 7/7	1/87 ± 0/35	2/5 ± 0/53
توپر	3/1 ± 0/3	47 ± 13/8	2 ± 0	2/53 ± 0/51
موکوپیدرموئید کارسینوما				
درجه‌ی پایین	2/67 ± 0/27	41/8 ± 9/9	2 ± 0	2/42 ± 0/53
درجه‌ی متوسط	2/92 ± 0/08	50 ± 16/6	2 ± 0	2/5 ± 0/57
درجه‌ی بالا	3/1 ± 0/1	59 ± 3/6	2 ± 0	2/66 ± 0/57

جدول 3: میانگین شمارش نقاط اکتور گزارش شده در تومورهای غدد بزاقی در بررسی های گوناگون

گونه ی	بررسی کنونی	اسلامی و همکاران (20)	آدیمی و همکاران (19)	ماتسومورا و همکاران (27)	مورگان و همکاران (18)	ون هیردن و همکاران (29)
پلنومورفیک آدنوما	1/29	1/71	1/67	1/62-1/68	1/47	1/52
آدنوتیدسیستیک کارسینوما	2/91	2/78	3/56	2/78	3/92	2/83
موکوپایدرموئید کارسینوما	2/84	2/61	3/17	2/59	4/25	1/93

شمارش نقاط در سلول های گوناگون جداگانه محسوب شده است.

بحث

روش اصلاح شده) در این بررسی مرتبط باشد، زیرا با این روش میزان رسوب نیترات نقره کمتر بوده، نقاط آشکارترند و خطا در شمارش نقاط کاهش می یابد.

در بیشتر بررسی های انجام شده، و نیز، در بررسی کنونی میانگین شمارش نقاط در ACC بیشتر از MEC است (18، 20، 20، 30). بیشتر بودن میانگین نقاط در ACC ممکن است با رفتار تهاجمی تر این تومور در مقایسه با MEC ارتباط داشته باشد.

در بررسی کنونی، بیشترین میانگین شمارش نقاط در ACC مربوط به انواع توپر بود، که این یافته با بررسی های آدیمی و یاماموتو (Yamamoto) همخوانی داشت (19 و 31).

در این بررسی ها میانگین شمارش نقاط در ACC های توپر به ترتیب 3/73 و 3/33 گزارش شد.

در بررسی های ون هیردن (Van Heerden) و آدیمی، میانگین شمارش نقاط در ACC های گونه ی غربالی بیشتر از گونه ی توپولار بود، که این نتایج نیز تأیید کننده نتایج بررسی کنونی است (19 و 30). در بررسی کنونی میانگین شمارش نقاط در MEC با درجه ی بدخیمی بالا بیشتر از میانگین نقاط با درجه ی بدخیمی متوسط و شمارش نقاط در بدخیمی های متوسط بیشتر از بدخیمی هایی با درجه پایین بود، که تأیید کننده ی نتایج دیگر بررسی هاست (25 و 32).

بیشتر بودن میزان تکثیر سلولی، سبب محدود شدن میزان تمایز در تومورهای گوناگون می گردد (25)، به همین دلیل بیشتر بودن میزان تکثیر با افزایش درجه ی بدخیمی همراه است.

در کارسینوم سلول سنگفرشی، همچنین در دیگر تومورها نیز افزایش نقاط اکتور در ارتباط با افزایش درجه ی بدخیمی نشان داده شده است (23، 33-35). بررسی های مورفومتریکی و کمی اکتور نشان داده است، که در سلول های تومورال بدخیم در مقایسه با سلول های تومورال خوش خیم شمار و پراکندگی نقاط در هسته افزایش یافته، اندازه ی نقاط کوچکتر شده و نقاط از لحاظ شکل نامنظم تر می گردند (36).

بررسی های زیادی در گذشته، کاربرد رنگ آمیزی اکتور را برای اهداف تشخیصی و پروگنوستیک مورد بررسی قرار داده اند (24) و تعیین کمیت نقاط اکتور به عنوان روشی مناسب برای بررسی کینتیک سلولی مورد استفاده قرار گرفته است (26). تجمع اکتور در مرحله ی اینترفاز با افزایش نیاز سلول به بیوژنز ریبوزومی همراه است. سنتز پروتئین در سلول هایی با سرعت تقسیم بالا در مقایسه با سلول هایی با سرعت تقسیم پایین سریع تر است، بنابراین افزایش شمار اکتور (محل هایی برای سنتز rRNA) در این سلول ها افزایش می یابد. از این رو خصوصیات اکتور به عنوان نمایه های قابل اعتماد برای ارزیابی سرعت تکثیر در نمونه های بافت شناختی معمول استفاده می شود (26 و 27).

در بررسی کنونی، میانگین شمارش نقاط و نمایه ی تکثیری در آسیب های التهابی کمتر از آسیب های خوش خیم و در آسیب های خوش خیم کمتر از آسیب های بدخیم بود. در آسیب های التهابی و خوش خیم میانگین اکتور کمتر از 2 و در آسیب های بدخیم بیشتر از 2 محاسبه شد، که نشان دهنده ی سرعت تکثیر بیشتر در آسیب های تومورال در مقایسه با آسیب های التهابی و همچنین سرعت تکثیر بیشتر در سلول های تومورال بدخیم نسبت به تومورهای خوش خیم است. در دیگر بررسی های انجام شده روی تومورهای بزاقی نیز میانگین شمارش نقاط در تومورهای بدخیم بیشتر از دو گزارش شد (18، 19، 20، 28).

فوجی تا (Fujita) و همکاران، میانگین شمارش نقاط اکتور در غدد بزاقی طبیعی را از 1 تا 1/8 گزارش کردند (29). در بررسی کنونی میانگین شمارش نقاط در آسیب های التهابی 1/11 محاسبه گردید. میانگین شمارش نقاط PA در بررسی کنونی، 1/29 محاسبه شد. در دیگر بررسی های انجام شده، در غدد بزاقی، میانگین شمارش نقاط در PA از 1/47 تا 1/71 گزارش شده است (18-20، 27) و (جدول 3). کمتر بودن میانگین شمارش نقاط در بررسی کنونی می تواند به تفاوت در روش رنگ آمیزی اکتور (استفاده از

نگردید. در این بررسی، با استفاده از روش اگنور اصلاح شده و همچنین، با بررسی خصوصیات اندازه و پراکندگی نقاط، سعی بر افزایش دقت بیشتر بررسی شد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

1- بررسی کمی و پراکندگی نقاط اگنور به عنوان روش‌های کمکی در کنار روش‌های آسیب‌شناسی بافت روتین جهت افتراق تومورهای خوش خیم غدد بزاقی از تومورهای بدخیم به ویژه بدخیمی‌هایی با درجه پایین مفید هستند.

2- بررسی اندازه و پراکندگی نقاط اگنور همراه با شمار نقاط و نمایه تکثیر، معیارهای قابل اعتمادتری جهت افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیم است.

3- انجام دیگر بررسی‌ها جهت بررسی شکل و حجم نقاط اگنور با روش‌های رایانه‌ای و روش‌های استاندارد، افزون بر شمار و پراکندگی نقاط، همچنین بررسی ارزش پروگنوزتیک خصوصیات این نقاط در بررسی‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به سبب حمایت مالی در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

در بررسی کنونی نیز، تفاوت در اندازه و پراکندگی نقاط در آسیب‌های التهابی و خوش خیم کمتر از تومورهای بدخیم بود. تومورهایی با نمایه تکثیری 8 درصد یا بیشتر دارای فعالیت تکثیری بالا هستند⁽³⁷⁾. نمایه تکثیری در تومورهای خوش‌خیم نزدیک به عدد 8 بوده و تا حدودی نشانه‌ی فعالیت تکثیری بالاست، اما اندازه و گسترش نقاط پراکندگی زیادی نشان نمی‌دهد. این نتایج با یافته‌های خان (Khan) و همکاران که مطرح کردند، تعیین اندازه و توزیع نقاط معیار قابل اطمینان‌تری جهت افتراق تومورهای بدخیم از خوش‌خیم است، همخوانی دارد⁽²⁵⁾. در واقع شمار نقاط ممکن است در شرایط راکتیو نیز افزایش یابد، در حالی که تغییر اندازه و پراکندگی نقاط تنها در شرایط بدخیمی دیده می‌شود⁽²⁵⁾.

میانگین شمارش نقاط، نمایه تکثیری، پراکندگی اندازه و توزیع نقاط میان تومورهای خوش‌خیم و درجه‌های پایین MEC اختلاف معنادار آماری نشان داد، بنابراین استفاده از این رنگ‌آمیزی در افتراق تومورهای خوش‌خیم از بدخیمی‌هایی با درجه‌ی پایین به ویژه در نمونه‌های کوچک به عنوان روشی مکمل کمک کننده است. بررسی نقاط اگنور با روش‌های مورفومتریک، دقیق‌تر است، اما به دلیل هزینه بر بودن و دسترسی نداشتن به امکانات لازم، امکان انجام بررسی با این روش میسر

References

- Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 233-245.
- Morimoto Y, Kito S, Ohba T, Morimoto H, Okamura H, Haneji T. Alteration of argyrophilic nucleolar organizer region associated (Ag-NOR) proteins in apoptosis-induced human salivary gland cells and human oral squamous carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 193-199.
- Rüschhoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 878-885.
- Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novello F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J Ultrastruct Res* 1983; 84: 161-172.
- Severgnini M, Ferraris ME, Carranza M. Nucleolar organizer regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 585-589.
- Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol* 2004; 15: 1319-1329.

7. Derenzini M, Pession A, Trerè D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990; 63: 137-140.
8. Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol* 1991; 165: 43- 51.
9. Suresh UR, Chawner L, Buckley CH, Fox H. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. *J Pathol* 1990; 160: 213-215.
10. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect Prev* 1995; 19: 282-291.
11. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 2000; 31: 133-141.
12. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000; 31: 117-120.
13. Spolidorio LC, Neves KA, Soares CP, Spolidorio DM, Basso MF, Malavazzi I, et al. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. *Micron* 2002; 33: 605-608.
14. Bukhari MH, Niazi S, Khan SA, Hashmi I, Perveen S, Qureshi SS, et al. Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. *Int J Exp Pathol* 2007; 88: 47-53.
15. Johns ME, Goldsmith MM. Incidence, diagnosis, and classification of salivary gland tumors. Part 1. *Oncology (Williston Park)* 1989; 3: 47-56.
16. Kolude B, Lawoyin JO, Akang EE. Salivary gland neoplasms: a 21 year review of cases seen at University College Hospital, Ibadan. *Afr J Med Med Sci* 2001; 30: 95-98.
17. Thomas KM, Hutt MS, Borgstein J. Salivary gland tumors in Malawi. *Cancer* 1980; 46: 2328-2334.
18. Morgan DW, Crocker J, Watts A, Shenoi PM. Salivary gland tumours studied by means of the AgNOR technique. *Histopathology* 1988; 13: 553-559.
19. Adeyemi BF, Kolude BM, Akang EE, Lawoyin JO. A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 513-520.
20. Eslami B, Rahimi H, Rahimi F, Khiavi MM, Ebadifar A. Diagnostic value of silver nitrate staining for nucleolar organizer regions in selected head and neck tumors. *J Cancer Res Ther* 2006; 2: 129-131.
21. Seifert G. Histologic typing of salivary gland tumors. 2nd ed. International histologic classification of tumors. World Health Organization: Geneva; 1991. p. 230-252.
22. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. p.389-430.
23. Guler N, Uckan S, Celik I, Oznurlu Y, Uckan D. Expression of Fas and Fas-ligand and analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in squamous cell carcinoma: relationships with tumor stage and grade, and apoptosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 900-906.
24. Alaeddini M, Khalili M, Tirgari F, Etemad-Moghadam S. Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and its relation to histological grade. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 758-762.
25. Khan SA, Chaudhry NA, Khalid AW, Akhtar GN, Ibne-Rasa SN. Patterns of argyrophilic nucleolar organiser regions in pleural and peritoneal effusions. *J Coll Physicians Surg Pak* 2006; 16: 412-415.

26. Crocker J. *Molecular biology in histopathology*. 2nd ed., Indianapolis: John Wiley & Son Ltd; 1994. p. 121-47.
27. Treré D, Ceccarelli C, Migaldi M, Santini D, Taffurelli M, Tosti E, et al. Cell proliferation in breast cancer is a major determinant of clinical outcome in node-positive but not in node-negative patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 314-323.
28. Matsumura K, Sasaki K, Tsuji T, Shinozaki F. The nucleolar organizer regions associated protein (Ag-NORs) in salivary gland tumors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989; 18: 76-78.
29. Fujita S, Takahashi H, Okabe H. Proliferative activity in normal salivary gland and pleomorphic adenoma. A study by argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 573-578.
30. van Heerden WF, Raubenheimer EJ. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 291-295.
31. Yamamoto Y, Itoh T, Saka T, Takahashi H. Nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252: 176-180.
32. Chomette GP, Auriol MM, Labrousse F, Vaillant JM. Mucoepidermoid tumors of salivary glands: histoprognotic value of NORs stained with AgNOR technique. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 130-132.
33. Nonomura A, Mizukami Y, Oda M, Shimizu J, Watanabe Y, Kamimura R, Takashima T. Demonstration of nucleolar organizer regions in lung carcinoma by silver staining. *Surg Today* 1993; 23: 486-490.
34. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E. Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions in CNS tumors: correlation with histological type and tumor grade. A comparative study of 82 cases on paraffin sections. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 912-919.
35. Fonseca LM, do Carmo MA. AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. *Braz Dent J* 2000; 11: 105-110.
36. Rivero ER, Caliarì MV, Tarquínio SB, Loyola AM, de Aguiar MC. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. *J Oral Sci* 2004; 46: 87-92.
37. Mourad WA, Vallieres E, Chuen J, Alrobaish A. Cell kinetics analysis of surgically resected non-small cell carcinoma of the lung using the AgNOR silver stain. *Ann Saudi Med* 1997; 17: 161-166.