

بررسی الگوی غشای پایه در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی با استفاده از رنگ آمیزی های رتیکولین، همتوکسیلین ائوزین و PAS

نویسندگان: دکتر نوشین جلاپرنادری^{1*}، دکتر منصور جمالی زواره ای² و دکتر اکرم نجاتیان³

1. استادیار، بخش آسیب شناسی دهان دانشکده دندان پزشکی دانشگاه شاهد
2. استاد، گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
3. دندانپزشک

Email: noushin_jly85@yahoo.com

* نویسنده مسئول:

چکیده

مقدمه: تغییرات بدخیمی سلول های اپی تلیالی تا زمانی که غشای پایه سالم است به اپی تلیوم محدود بوده، تهاجمی به بافت همبند دیده نمی شود. تخریب این غشای، اولین گام در تهاجم موضعی است. با توجه به اهمیت تشخیص تغییرات غشای پایه این مطالعه با هدف بررسی الگوی هیستوپاتولوژیک این غشا در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی با استفاده از رنگ همتوکسیلین - ائوزین (Haematoxylin & Eosin)، رتیکولین و پریودیک اسید شیف Periodic acid Schiff (PAS - Schiff) انجام شد.

مواد و روش ها: این تحقیق در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول با بازنگری پرونده بیماران مراجعه کننده به بخش پاتولوژی مرکزی بیمارستان امام خمینی از سال 77 تا 82 از مجموع 120 نمونه، 21 مورد با تشخیص پاتولوژیک دیسپلازی خفیف، متوسط و شدید و سرطان سلول سنگفرشی (اسکوموس سل کارسینوما) با تمایز خوب که فاقد نکروز، آماس و خونریزی بودند انتخاب شدند. در مرحله دوم از هر بلوک پارافینی، 3 برش 3 میکرونی تهیه و با رنگ های پریودیک اسید شیف، همتوکسیلین - ائوزین و رتیکولین رنگ شدند و الگوی رنگ پذیری غشای پایه توسط دو پاتولوژیست به روش دو سویه کور بررسی شد.

نتایج: اپی تلیوم طبیعی در رنگ آمیزی با H&E غشای پایه واضح بود و با رنگ PAS و رتیکولین ضخیم و ممتد دیده می شد. دیسپلازی خفیف: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه نازک و یکنواخت و با رنگ PAS ممتد و با رتیکولین ضخیم و ممتد دیده می شد. دیسپلازی متوسط: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه ناواضح با PAS واضح و در رنگ آمیزی با رتیکولین ضخیم و غیرممتد بود و بی نظمی هایی در لایه رتیکولر مشاهده می شد. دیسپلازی شدید: در رنگ آمیزی با H&E غشای پایه ناواضح، با PAS ظریف و بسیار نازک و با رتیکولین بسیار نازک بود و ظرافتی متغیر داشت. سرطان سلول سنگفرشی با تمایز خوب: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه ناواضح و در رنگ آمیزی با PAS بسیار ظریف بود. در اطراف توده های سلولی موجود در بافت همبند غشای پایه در رنگ آمیزی با رتیکولین ممتد بود، در حالی که در نوک رت پگها ضخامتی بسیار نازک و غیرممتد داشت. بحث و نتیجه گیری: الگوی هیستوپاتولوژیک غشای پایه در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان سلول سنگفرشی با تمایز خوب متفاوت است. رنگ رتیکولین در مقایسه با رنگ های PAS و H&E توانایی بیشتری در نمایش این تغییرات دارد.

واژه های کلیدی: دیسپلازی، سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی، رتیکولین، همتوکسیلین و ائوزین، پریودیک اسید شیف

دوماهنامه علمی -
پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال چهاردهم - شماره
68
اردیبهشت 1386

وصول: 84/3/27
ارسال اصلاحات:
84/11/18
دریافت اصلاحات:
85/2/25
نذب ش: 85/3/27

مقدمه

غشای پایه، غشایی ظریف به ضخامت 1-2 میکرومتر است که بافت پوششی را حمایت می‌کند و مرز مشترک بین اپی‌تلیوم و بافت همبند است. این لایه از تیغه پایه و تیغه رتیکولار تشکیل می‌شود. تیغه پایه شامل دو لایه 45-50 نانومتری به نام لامینا لوسیدا و لامینا دنسا و تیغه رتیکولار متشکل از الیافی به قطر 0/1 میکرون است که ساختمانی بسیار مشابه به کلاژن دارند. این الیاف به علت دارا بودن کربوهیدرات بیش‌تر با رنگ‌های PAS و نقره رنگ شده، اما با رنگ هماتوکسیلین - ائوزین به خوبی مشاهده نمی‌شوند [2و1]. تغییرات بدخیمی سلول‌های اپی‌تلیالی تا زمانی که غشای پایه، سالم و دست نخورده است به اپی‌تلیوم محدود بوده، تهاجمی به بافت همبند دیده نمی‌شود. تخریب غشای پایه و به تبع آن، دسترسی سلول‌های بدخیم به بافت همبند، اولین مرحله تهاجم موضعی و متاستاز است که تحت عنوان تهاجم میکروینوئیزیو نامیده شده است. تشخیص این تهاجم از لحاظ هیستوپاتولوژیک به راحتی امکان‌پذیر نیست [3]. کارتر (Carter) و همکاران او، ضخیم‌شدگی، تجمع و از دست رفتن قطعه غشای پایه را در کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم گزارش کرده‌اند [4]. ساکر (Sakar) و همکارانش نیز با بررسی اجزای غشای پایه گزارش کرده‌اند که غشای پایه در مخاط طبیعی مشخص و پیوسته و در دیسپلازی شدید و کارسینوم درجا نازک و ناپیوسته است [5]. واضح است که کشف تهاجمات اولیه و زودرس و یافتن راهی برای تشخیص سریع آن اهمیت زیادی خواهد داشت و بدیهی است که غشای پایه، نقش مهمی در این تشخیص دارد. بدین ترتیب در دست داشتن الگویی برای تشخیص اولیه که با استفاده از رنگ‌های موجود در آزمایشگاه‌های پاتولوژی امکان‌پذیر باشد از اهمیت زیادی برخوردار خواهد بود. رنگ‌های رتیکولین و PAS دو نمونه از رنگ‌های بسیار مهم و کاربردی در هر آزمایشگاه پاتولوژی هستند. با در نظر گرفتن آن‌که رنگ رتیکولین توانایی نمایش

رشته‌های رتیکولر و رنگ PAS قادر به نشان دادن غشای پایه هستند، بر آن شدیم با هدف بررسی الگوی غشای پایه در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان سلول سنگفرشی با تمایز خوب، با استفاده از رنگ‌های رتیکولین، هماتوکسیلین - ائوزین و PAS به بررسی الگوی هیستوپاتولوژیک غشای پایه در این ضایعات پردازیم. بدین ترتیب، آگاهی از این تغییرات می‌تواند در ارائه الگویی در جهت تشخیص زود هنگام تهاجمات اولیه مفید واقع گردد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر که به روش توصیفی غیر پارامتریک انجام گرفت، دو مرحله داشت: در مرحله اول با بازنگری پرونده بیماران مراجعه‌کننده به بخش آسیب‌شناسی مرکزی بیمارستان امام خمینی از سال 1377 تا 1382 از میان 120 نمونه که تشخیص آن‌ها دیسپلازی و سرطان سلول سنگفرشی با تمایز خوب بود، در مجموع 6 نمونه دیسپلازی خفیف، 5 نمونه متوسط، 4 نمونه شدید و 6 نمونه سرطان سلول سنگفرشی با تمایز خوب از میان کل نمونه‌های موجود که فاقد خونریزی، نکروز و آماس بودند و اتصال بین اپی‌تلیوم و بافت همبند حفظ شده بود، انتخاب شدند. علاوه بر آن، نمونه‌های انتخاب شده از مرکز ضایعه بود و برش‌های مارژینال در نمونه‌گیری لحاظ نشدند. در مرحله بعد، از هر بلوک 3 برش به ضخامت 3 میکرومتر تهیه شد و این برش‌ها با رنگ PAS، هماتوکسیلین - ائوزین و رتیکولین رنگ شدند. در مرحله آخر، نمونه‌های رنگ شده توسط دو پاتولوژیست به صورت دو سویه کور از لحاظ رنگ‌پذیری و الگوی هیستوپاتولوژیک غشای پایه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل به صورت توصیفی از الگوی هیستوپاتولوژی غشای پایه ارائه گردید.

یافته‌ها

مطالعه میکروسکوپیک برش‌های 3 میکرونی رنگ شده با رنگ‌های H&E، PAS و رتیولین بیانگر یافته‌های زیر بود:

الف) اپی‌تلیوم طبیعی: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه واضح و در رنگ آمیزی با PAS و رتیولین غشای پایه ضخیم و ممتد دیده می‌شد.

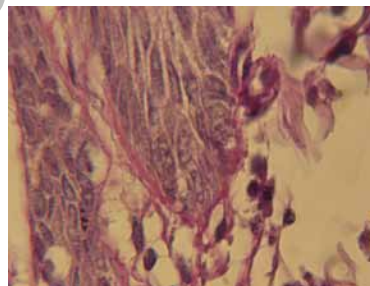
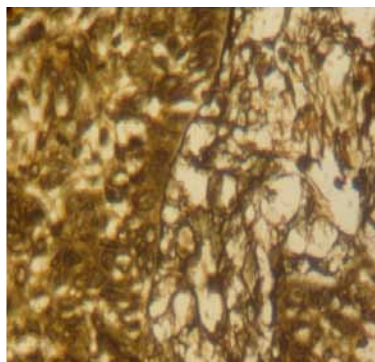
ب) دیسپلازی خفیف: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه نازک و یکنواخت، در رنگ آمیزی با PAS ممتد و یکنواخت و در رنگ آمیزی با رتیولین ضخیم و ممتد بود. رشته‌های رتیولار به موازات پوشش خاردار قرار داشتند (تصویر 1).

ج) دیسپلازی متوسط: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه واضح نبود، اما در رنگ آمیزی PAS کاملاً واضح و

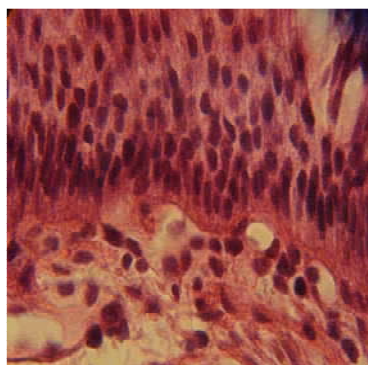
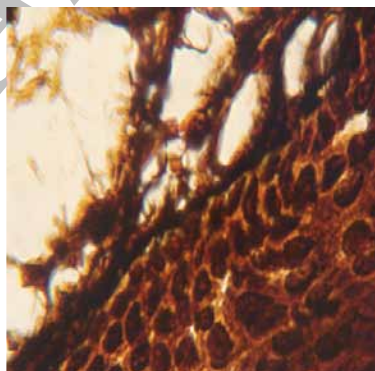
ضخیم و در رنگ آمیزی رتیولین ضخیم و ممتد بود (تصویر 2).

د) دیسپلازی شدید: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه واضح نبود، اما در رنگ آمیزی PAS غشاء پایه ظریف و در رنگ آمیزی با رتیولین بسیار نازک و غیرممتد بود (تصویر 3).

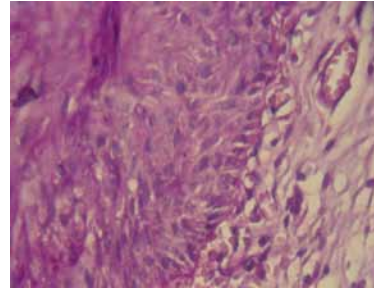
هـ) کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز خوب: در رنگ آمیزی H&E غشای پایه واضح نبود، در حالی که در رنگ آمیزی با PAS و رتیولین بسیار ظریف مشاهده می‌شد. در رنگ آمیزی رتیولین در اطراف توده‌های سلولی، غشای پایه ممتد بود و در اطراف توده‌های سلولی و رت پگ‌ها ضخامت بسیار اندک داشت (تصویر 4 و 5).



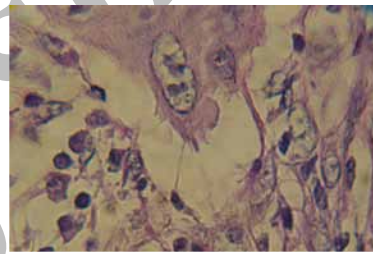
الف) رنگ آمیزی PAS: غشای پایه، ممتد و یکنواخت است. ب) رنگ آمیزی رتیولین: غشای پایه، واضح و ممتد است. تصویر 1 تغییرات غشای پایه در دیسپلازی خفیف (100x)



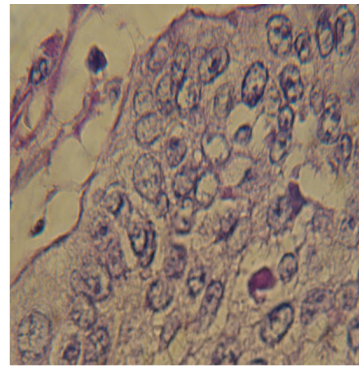
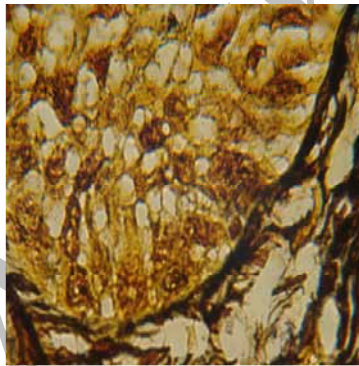
الف) رنگ آمیزی PAS: غشای پایه، ضخیم و واضح است. ب) رنگ آمیزی رتیولین: غشای پایه، ضخیم و ممتد است. تصویر 2 تغییرات غشای پایه در دیسپلازی متوسط (100x)



الف) رنگ آمیزی PAS: غشای پایه، ظریف و ناواضح است. (ب) رنگ آمیزی رتیכולین: غشای پایه، نازک و غیرممتد است
تصویر 3 تغییرات غشای پایه در دیسپلازی شدید (100x)



الف) رنگ آمیزی PAS: غشای پایه، واضح نیست. (ب) رنگ آمیزی رتیכולین: غشای پایه، واضح نیست.
تصویر 4 تغییرات غشای پایه در سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی در بخش‌های تهاجم اپی تلیال (100x)



الف) رنگ آمیزی PAS: غشای پایه، ممتد و واضح است. (ب) رنگ آمیزی رتیכולین: غشای پایه، ممتد و واضح است.
تصویر 5 تغییرات غشای پایه در سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی در بخش‌های اپی تلیالی درون بافت همبند (100x)

رنگ پذیری از متوسط تا شدید تفاوت داشت. در انواع شدید، غشای پایه ظریف و غیرممتد بود و در کارسینوم سلول سنگفرشی با تمیز خوب، در ناحیه رت پگ‌ها غیریکنواختی و تفاوت در شدت رنگ پذیری

بحث
در مطالعه حاضر، غشای پایه در دیسپلازی خفیف یکنواخت، ممتد و ضخیم بود، در انواع متوسط در عین ضخامت کاملاً ممتد و یکنواخت نبود و شدت

یافته در مطالعات انجام شده به روش ایمونوهیستوشیمیایی دقیق تر توجیه می شود.

کاتوس (Cotusse) و همکاران او تغییر ترکیب ساختاری کلاژن نوع VII و لامینین را طی پیشرفت تومور گزارش کرده و بر این نکته که غشای پایه جزئی دینامیک در پیشرفت تومور و عاملی مهم در تهاجم سلول های تومورال است، تأکید کرده اند [9].

کائو (Cao) و همکارانش در بررسی کارسینوم سلول سنگفرشی حنجره نشان داده اند که هر چه میزان تمایز بافت شناختی ضایعه ضعیف تر باشد، نواقص غشای پایه شدیدتر خواهد بود. علاوه بر آن، کاهش بیان کلاژن نوع IV با تهاجم همراه است. ایشان بررسی غشای پایه را روش مفیدی در درجه بندی بدخیمی کارسینوم حنجره می دانند [10].

سان (Sun) و همکاران او، کاهش اثر کادهرین E را یکی از راه های تمایز تومور و به تبع آن، تهاجم عمقی کارسینوم می دانند [11]. مالینا (Malina) و همکارانش نیز بیان زنجیره گاما 2 لامینین 5 و MMP-2 را در تغییرات نئوپلاستیک اپی تلیوم اسکواموس گزارش می کنند [12]. آنچه مسلم است ساختمان غشای پایه در عبور از

دیسپلازی به تهاجم بافتی تغییر می کند، اما آنچه مهم باقی می ماند شناسایی این تغییرات است. در مطالعه حاضر، مقایسه تغییرات غشای پایه در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی، نشان دهنده تغییرات غشای پایه بود، اما مقایسه رنگ های به کار رفته جهت بررسی این تغییرات نشان داد که رنگ همتوکسیلین - ائوزین توانایی نمایش دقیق تغییرات ایجاد شده در غشای پایه را ندارد، در حالی که رنگ PAS این تغییرات را با دقت بیشتری نمایش می دهد. از طرف دیگر، رتیکیلین ممتد بودن یا غیریکنواختی و حتی ضخامت غشای پایه را در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی بهتر نشان داد. بدین ترتیب، یافته های این مطالعه مؤید این نکته بود که رنگ آمیزی غشای پایه با رنگ رتیکیلین در نمایش تغییرات غشای پایه بر PAS

رتیکیلین مشهود بود، درحالی که در جزائر اپی تلیالی موجود در بافت همبند، رنگ پذیری در اطراف جزائر ممتد و از متوسط تا شدید تفاوت داشت. پیتو (Pinto) و همکاران او با بررسی غشای پایه در کارسینوم سرویکس به این نتیجه دست یافتند که در کارسینوم سلول سنگفرشی، عدم یکپارچگی غشای پایه به صورت موضعی یا منتشر دیده می شود. در کارسینوم در جا غشای پایه به شکل ممتد و در حالت میکرونیویزیو، تمایل واضح به گسیختگی وجود دارد [6]. کانان (Kannan) نیز با بررسی غشای پایه به روش ایمونوهیستوشیمیایی نشان داده که شدت رنگ پذیری، ضخامت و یکپارچگی غشای پایه با مراحل مختلف پیشرفت تومور نسبت عکس دارد [7]. ساکر (Sakar) و همکارانش نیز گزارش می کنند که در دیسپلازی های اپی تلیالی خفیف و متوسط، غشای پایه ضخیم و ممتد است، درحالی که در بخش تهاجمی اپی تلیوم به بافت همبند غشای پایه در حد فاصل استروما - تومور وجود ندارد. ایشان چنین نتیجه گیری می کنند که نئوپلاسم های داخل اپی تلیالی غالباً با ایجاد بی نظمی در غشای پایه همراهند [5].

مطالعه ما بیانگر تغییرات الگوی هیستوپاتولوژیک غشای پایه بود به طوری که در عبور از یک دیسپلازی خفیف به شدید ضخامت و شدت رنگ پذیری غشای پایه تفاوت داشت. در انواع خفیف، غشای پایه ضخیم و ممتد و در دیسپلازی شدید، ظریف و غیرممتد بود. این یافته تأییدی بر تغییرات ایجاد شده در دیسپلازی است. به طور کلی، گذر از یک دیسپلازی و ورود به مرحله تهاجم نیازمند 4 مرحله است که دو مرحله آخر، تجزیه موضعی غشای پایه و بافت همبند بینابینی را شامل می شود. در این مراحل، آنزیم های متالوپروتیناز، شامل ژلاتیناز، کلاژناز و استرامیلیناز از سلول های تومور یا فیبروبلاست ترشح می شوند. در طی این رویداد که در مراحل آخر دیسپلازی شدید آغاز می شود، منطقی است که تصور کنیم آزاد شدن متالوپروتینازها باعث تغییر شکل شبکه رتیکولر شده، این تغییر در رنگ آمیزی نقره مشهود گردد [8]. این

منابع

1. حیدری، زهرا، محمودزاده ثاقب حمید رضا، نوری موگهی سید محمد حسین: بافت‌شناسی و جنین‌شناسی اختصاصی دهان و دندان. چاپ اول، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، نشر طبیب، تهران، 1381، صفحات 178-181.
2. رجحان، محمد صادق: بافت‌شناسی انسانی پایه، انتشارات چهر، تهران، 1374، صفحات 67 - 68.
3. Rosai J: Surgical pathology , Edinburg , Mosby, 2004 pp:230 - 233.
4. Carter RL , Burman JE , Barr L , Gusterson BA. Immunohistochemical localization of basement membrane type IV collagen in invasive and metastatic squamous carcinomas of the head and neck. J pathol 1985: 147 (3): 159 -64.
5. Sakr WA , Zarbo RJ, Jacobs JR ,Crissman JD. Distribution of basement membrane in squamous cell carcinoma of the head and neck. Hum Pathol 1987: 18(10): 1043 - 50.
6. Pinto GA , Vassallo J , Andrade LA , Magna LA. Immunohistochemical study of basement membrane collagen IV uterine carcinoma. Sao Paulo Med J 1998 : 116 (6): 1846 - 51.
7. Kannan S , Balaram P , Chandran GJ , Pillai MR , Mathew B , Naliakumari KR , Nair MK. Alteration in expression of basement membrane proteins during tumor progression in oral mucosa. Histopathology 1994: 24(6): 531 -7.
8. Robins S, Kumar V, Cotran R: Basic pathology. 7 ed. Philadelphia. Saunders Co; 2000: 191 - 2.
9. Cousse C , Polette M, Coraux C , Burlet H , Birembaut P. Modified basement composition during bronchopulmonary tumor progression. J Histochem Cytochem 2000: 48 (5): 663 -9.
10. Cao Z, Wang Y, Ren Z. Basement membrane in squamous cell carcinoma of the larynx: an immunohistochemical study. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Zs Zhi 2000: 35 (6): 457 - 60.
11. Sun W, Herrera GA. E - Cadherin expression in invasive urothelial carcinoma. Ann Diagn Pathol 2004; 8 (1): 17 - 22.
12. Malina R, Motoyama S, Hamana S, Maruo T. Laminin - 5gamma 2 chain and matrix metalloproteinase-2 expression in the neoplastic changes of uterine cervical squamous epithelium. Kobe J Med Sci 2004: 50 (3-4):123 -30.
13. Yamasaki M, Ueda G, Inoune M, Tanaka Y, Kurachi K. Correlative light and immunohistological study of the basement membrane of the human squamous cervical carcinoma. Nippon Sanka Fuginka Gakkai Zasshi 1980:32(11): 1859-64.
14. Karttunen T. Basement membrane proteins and reticulin in a normal thymus and the thymus in myasthenia gravis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1987: 411(3): 245-52.

ارجح بوده، توانایی نشان دادن تغییرات غشای پایه را که با رنگ‌های هماتوکسیلین - ائوزین و PAS دیده نمی‌شوند، دارد. یافته‌های یاماساکی (Yamasaki) و همکاران او مؤید یافته فوق است. ایشان گزارش می‌کنند که غشای پایه در کارسینوم در جا، کارسینوم سلول سنگفرشی میکروینویزیو و مهاجم، جایی که با روش ایمونوفلورسانس وضوح مشخص ندارد، در رنگ‌آمیزی با PAS به خوبی رنگ می‌شود. این بدان معنا است که تخریب غشای پایه با PAS به خوبی مشخص نمی‌شود [13]. در خصوص استفاده از رنگ‌های هیستوشیمی تنها یافته ما در مقالات، مطالعه کارتتونن (Karttunen) بود. ایشان با بررسی غشای پایه به روش ایمونوهیستوشیمی و هیستوشیمی با استفاده از رنگ رتیכולین به این نتیجه دست یافتند که رشته‌های رتیכולین مدولا و فضای پره واسکولار، حاوی لامینین و کلاژن نوع IV هستند [14]. به این ترتیب به نظر می‌رسد رنگ رتیכולین توانایی بیش‌تری در نمایش تغییرات غشای پایه دارد. با لحاظ کردن این نکته که آزاد شدن متالوپروتئینازها در مراحل آخر دیسپلازی، باعث تغییر شکل شبکه رتیکولر غشای پایه می‌شوند، اهمیت رنگ رتیכולین در نمایش این تغییرات واضح خواهد شد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که الگوی هیستوپاتولوژیک غشای پایه در درجات مختلف دیسپلازی و سرطان تمایز یافته سلول سنگفرشی متفاوت است، به طوری که با بررسی تعداد بیش‌تری نمونه می‌توان به الگویی مشخص جهت تشخیص زودرس تهاجمات سلولی و تخریب غشای پایه دست یافت. علاوه بر آن، رنگ رتیכולین در مقایسه با هماتوکسیلین - ائوزین و PAS توانایی بیش‌تری در نمایش این تغییرات دارد. استفاده از این رنگ به همراه رنگ هماتوکسیلین - ائوزین در بررسی تغییرات غشای پایه نتایج دقیق‌تری را فراهم می‌آورد.