Archive of SID

بررسی ارزش تشخیصی رنگ آمیزی سیتوکراتین در شناسایی متاستازهای منفرد سلولی در گره های لنفاوی زیر بغلی در بیماران مبتلا به کارسینوم پستان

چکیده

مقدمه: سرطان پستان، شایع ترین سرطان در زنان به شمار می آید. با توجه به این که مهم ترین عامل در تعیین پیش آگهی و درمان کارسینوم پستان مهاجم، گرفتاری گره های (غدد) لنفاوی زیر بغلی است و با آگاهی از این مطلب که، روش های متداول، مانند رنگ آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین (H&E) همواره در تشخیص متاستازهای منفرد سلولی (میکرومتاستازها) بدون دقت تشخیصی لازم است، بر آن شدیم تا با انجام این پژوهش، با استفاده از پادگن های (آنتی ژن) درون سیتوپلاسمی و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC)، دقت تشخیصی متاستازهای منفرد سلولی بیازماییم. بنابراین، هدف از انجام این بررسی، تعیین ارزش تشخیصی رنگ آمیزی سیتوکراتین در شناسایی متاستازهای منفرد سلولی در گره های لنفاوی زیر بغلی در بیماران مبتلا به کارسینوم پستان بود. **روش کار**: در یک بررسی مقطعی تحلیلی- مقایسه‌ای، شمار ۸۲ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان به روش نمونه‌گیری آسان از میان بیمارانی برگزیده شدند، که در سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۲ به مرکز پزشکی الزهراء (س) اصفهان مراجعه کردنده بودند. ضمن به دست آوردن اطلاعات مورد نیاز در باره ی بیماران، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و ایمونوهیستوشیمی بر روی برش های بافتی مربوط به گره های لنفاوی زیر بغلی در بیماران انجام شد. سپس، بررسی میکروسکوپی دو روش رنگ‌آمیزی انجام گردد. برای واکاوی یافته ها، از آزمون آماری مربع کای (X^2) استفاده شد و p کمتر از ۰/۰۵، معنی دار انگاشته گردید. **یافته ها**: فراوانی نسبی متاستازهای منفرد سلولی در گره های مورد اشاره، با روش هماتوکسیلین- ائوزین و سیتوکراتین (CK)، به ترتیب، ۱۵/۸۵ و ٤٦/٣٤ درصد به دست آمد. **نتیجه**: فراوانی نسبی متاستازهای منفرد سلولی با روش سیتوکراتین در این

دکتر زین العابدین بهدادی پور*،
دکتر مژگان مختاری**،
دکتر پروین رجبی***،
مهین صابری****،
*استادیار گروه علوم تشریحی،
**استادیار گروه آسیب شناسی،
***دانشیار گروه آسیب شناسی
****کارشناس ارشد
بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نویسنده مسوول:
دکتر زین العابدین بهدادی پور
اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۴۳۰
دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۴۶۴
E-mail:
behdadipour@med.mui.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش، با میانگین یافته های پژوهش های همانند در جهان همخوانی دارد. در این بررسی، ارزش تشخیصی رنگ آمیزی سیتوکراتین، به مراتب بیشتر از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بودکه، این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($p<۰/۰۰۱$). بنابراین، می توان نتیجه گرفت که، روش رنگ آمیزی سیتوکراتین می تواند به تشخیص در مراحل آغازین متاستاز کمک زیادی کند و تشخیص دقیق تر متاستاز در سرطان ها، می‌تواند در درمان زود هنگام و پیش آگهی بیماری مؤثر باشد.

کلید واژه ها: سرطان پستان، متاستاز منفرد سلولی، گره های لنفاوی، ایمونوهیستوشیمی، رنگ‌آمیزی سیتوکراتین

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان Site Specific در زنان و شایع ترین علت مرگ و میر در زنان۴۰ تا ٤٤ ساله است [۱]. بر پایه ی گزارش برخی منابع، از هر هشت تا نه نفر زن امریکایی، یک نفر به این بیماری دچار می‌شود [۲]. در سال ۱۹۹۸، شمار ۱۷۸۷۰۰ مورد جدید سرطان پستان در امریکا مشاهده شده است که، ۱٦۰۰ مورد سرطان در مردان را نیز باید به این آمار افزود. در همان سال، شمار ٤۳٥۰۰ زن، به دلیل ابتلاء به این بیماری در گذشتند [۳].

در گزارشی مشخص شده است که، میزان بروز سرطان پستان در زنان سفید پوست بیشتر از زنان سیاه پوست است. اما باید توجه کرد که، میزان مرگ و میر در اثر سرطان پستان در زنان سیاه پوست بیشتر ازسفید پوستان است و میزان طول عمر در سیاه پوستان، نسبت به سفید پوستان، با مرحله ی بیماری یکسان، کوتاه تر است [٤]. عوامل زمینه ساز فراوانی، مانند پیشینه ی خانوادگی، پیشینه ی گرفتن پرتو، تغذیه و هورمون ها در افراد، باعث افزایش بروز سرطان پستان می‌شوند [٦،٥]. عوامل دیگر نیز، به عنوان عوامل خطر بیان شده اند که، عبارت هستند از، طول مدت زمان باروری و زایمان، افزایش سن، سن به هنگام نخستین زایمان، چاقی و وضعیت تأهل [٥]. از عوامل مؤثر بر پیش آگهی سرطان پستان، می‌توان به سن بیمار، تشخیص زود هنگام، تهاجم، اندازه ی تومور، رده بندی تومور و دست اندازی (متاستاز)، اشاره کرد [۷]. با توجه به شایع بودن این گونه سرطان در زنان، لازم است تا در تشخیص بیماری و تعیین پیش آگهی دقت زیاد گردد. یکی از مهم ترین عوامل مؤثر در تعیین پیش آگهی، عود و ماندگاری در سرطان پستان، وضعیت درگیری گره های لنفی است. از سویی، بیشترین گره های لنفی گرفتار در سرطان پستان، گره های لنفی زیر بغلی (آگزیلاری) است که، ۷٥ درصد لنف پستان را دریافت می کنند [۸].

تشخیص دست اندازی به گره های لنفاوی، به ویژه اگر در مراحل آغازین و محدود به شمار اندکی از سلول ها باشد (Micrometastases)، با روش معمول رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،

www.SID.ir

Archive of SID

اغلب قابل تشخیص نیست [۹]. بنابراین، برای تشخیص دقیق متاستازهای منفرد سلولی به گره های لنفاوی، از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شود که، البته هزینه ای بالا را در بر دارد [۱۰]. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ارزش تشخیصی رنگ آمیزی سیتوکراتین در شناسایی متاستازهای منفرد سلولی به گره های لنفاوی زیر بغلی در بیماران مبتلا به کارسینوم پستان، که با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین منفی‌گزارش شده است، بود.

مواد و روش

در این بررسی که، به شیوه ی مقطعی و گذشته نگر انجام شد، بیماران دچار سرطان بدخیم پستان برگزیده شدند که، در سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۲ به مرکز پزشکی الزهراء (س) اصفهان مراجعه کرده بودند. شمار نمونه ی لازم با محاسبه ی آماری، ۸۲ مورد غده ی لنفاوی زیر بغلی بود که، از زنانی که، به سرطان مهاجم پستان دچار بودند، به هنگام عمل برداشتن پستان جدا شده بود. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت و سپس، مراحل گوناگون آماده سازی و قالب‌گیری انجام شد. از بخشی از نمونه، برش های پنج میکرونی فراهم و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید. همچنین، از همان قالب، برش های دو میکرونی برای رنگ آمیزی با روش سیتوکراتین فراهم شد. این نمونه‌ها، با روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آویدین- بیوتین - پراکسید، برای شناسایی پروتئین سیتوکراتین در سلول های دست اندازی کرده به گره های لنفاوی، رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شد. شمار نمونه‌های مثبت با روش های رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و سیتوکراتین مشخص و با برنامه ی نرم افزاری Epi Info 6 و آزمون آماری مربع کای (X^2) واکاوی آماری شدند.

یافته ها

شمار کل نمونه‌ها، ۸۲ مورد گره لنفاوی بود که، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ۱۳ مورد (۱۵/۸۵ درصد) نمونه ها مثبت و با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین، ۳۸ مورد (٤٦/٣٤ درصد) نمونه ها مثبت بود (جدول ۱). تفاوت میان دو روش رنگ آمیزی از نظر آماری معنی دار بود

جدول ۱: توزیع فراوانی متاستازهای منفرد سلولی به گره های لنفاوی زیر بغلی در سرطان های پستان با دو روش‌رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و سیتوکراتین

نتیجه	مثبت		منفی		جمع	
روش رنگ آمیزی	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد
هماتوکسیلین-ائوزین	۱۳	۱۵/۸۵	۶۹	۸۴/۱۵	۸۲	۱۰۰
سیتوکراتین	۳۸	۴۶/۳۴	۴۴	۵۳/۶۶	۸۲	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: توزیع فراوانی متاستازهای منفرد سلولی به غدد لنفاوی زیر بغلی در سرطان های پستان درجه ی یک، دو و سه، با دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و سیتوکراتین

روش رنگ آمیزی	درجه یک						درجه دو						درجه سه					
	مثبت		منفی		جمع		مثبت		منفی		جمع		مثبت		منفی		جمع	
	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد	شمار	درصد
هماتوکسیلین	۲	۱۶/۶۷	۱۰	۸۳/۳۳	۱۲	۱۰۰	۴	۱۴/۲۹	۲۴	۸۵/۷۱	۲۸	۱۰۰	۶	۱۶/۶۷	۳۰	۸۳/۳۳	۳۶	۱۰۰
سیتوکراتین	۵	۴۱/۶۷	۷	۵۸/۳۳	۱۲	۱۰۰	۱۶	۵۷/۱۴	۱۲	۴۲/۸۶	۲۸	۱۰۰	۱۴	۳۸/۸۹	۲۲	۶۱/۱۱	۳۶	۱۰۰

(p< ۰/۰۰۱). از ۸۲ بیمار، شش مورد به سرطان لوبولار دچار بودند که، رده بندی برای آنها انجام نگرفت. دیگر موارد، از گونه ی مجرایی (داکتال) بودند که، رده بندی شدند. به این ترتیب، فراوانی متاستازهای منفرد سلولی به گره های لنفاوی زیر بغلی درسرطان های پستان درجه ی یک، دو و سه با دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و سیتوکراتین تعیین گردید. تفاوت دو روش در باره ی سرطان پستان درجه ی دو و سه معنی دار بود (به ترتیب، p= ۰/۰۰۱ و p=۰/۰۳۵). تفاوت دو روش رنگ آمیزی در مورد سرطان پستان درجه یک معنی دار نبود (جدول ۲).

شمار ۱۳ مورد (۱۵/۸۵ درصد) از نمونه ها که، با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین مثبت بود، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین هم مثبت شد. شمار ۲۵ مورد (۳۰/٤۹ درصد) از نمونه ها که، با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین مثبت بود، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین منفی بود. شمار ٤٤ مورد (۵۳/٦٦ درصد) در هر دو روش رنگ آمیزی منفی بود و هیچ موردی که، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین مثبت و با روش سیتوکراتین منفی باشد، وجود نداشت (جدول ۳).

بحث

از آنجا که، سرطان های پستان شایع ترین گونه ی سرطان در زنان است [۱۰]، تشخیص و درمان به هنگام باعث نجات جان بسیاری از مبتلایان می‌شود [۱۱]. روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی در مقایسه با روش رنگ‌آمیزی معمولی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی متاستازهای منفرد سلولی در گره های لنفاوی زیر بغلی با دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و سیتوکراتین

هماتوکسیلین-ائوزین / سیتوکراتین	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۱۳	۲۵	۳۸
منفی	۰	۴۴	۴۴
جمع	۱۳	۶۹	۸۲

(هماتوکسیلین–ائوزین) از حساسیتی بالاتر برخوردار است [۹]. با توجه به این که، نخستین جایی که دست اندازی سرطان پستان در آن دیده می شود، گره های لنفاوی زیر بغل است و با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به روش سیتوکراتین، حتی می‌توان چند سلول سرطانی را شناسایی کرد، بنابراین استفاده از این روش باعث تشخیص دقیق متاستازهای منفرد سلولی به گره های لنفاوی می‌شود. در این بررسی، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین ۱۵/۸۵ درصد از گره های لنفاوی از نظر دست اندازی مثبت گزارش شدند، در حالیکه با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین، این اندازه به ٤٦/٣٤ درصد رسید.

در پژوهشی در سال ۱۹۹۲، شمار ۲۳ درصد موارد با روش سیتوکراتین، مثبت تشخیص داده شد. در سال ۱۹۹۳، هینزورث، به ۱۲ درصد موارد مثبت با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین دست یافت [۱۲]. همچنین در یک بررسی همانند در کالیفرنیا، در سال ۱۹۹۸، از ۲٦ مورد متاستاز منفرد سلولی به گره های لنفاوی، ۱۱ مورد (٤۲/۳ درصد) با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین مثبت تشخیص‌داده شد [۱۳]. همان گونه که، مشاهده می‌شود، فراوانی نسبی تشخیص با روش رنگ آمیزی سیتوکراتین در مراکز گوناگون متفاوت گزارش شده است. یافته های بررسی کنونی تقریباً برابر با میانگین یافته ها در مراکز گوناگون جهان است. تفاوت ها می‌تواند ناشی از مهارت در انجام آزمایش و سطح فرهنگی جامعه باشد. از نظر فرهنگی، با توجه به این که، در کشورهای پیشرفته، با آزمون های ماموگرافی و معاینه ی شخصی پستان، سرطان های پستان در مراحل نخستین تشخیص داده می‌شوند و از سویی، احتمال دست اندازی در مراحل نخستین (متاستاز منفرد سلولی) بیشتر است، بنابراین، ارزش تشخیصی روش رنگ آمیزی سیتوکراتین بهتر آشکار می‌گردد. نکته ی دیگر این که، هزینه ی انجام این آزمایش بسیار بالا ست و احتمالاً پرداخت این هزینه، به عنوان آزمایش های معمولی برای شخص مراجعه کننده امکان پذیر نیست.

نتیجه گیری

روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نسبت به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین یک روش دقیق تر و حساس تر است و پیشنهاد می‌شود با وجود هزینه ی بالای انجام آن، برای تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

متاستازهای منفرد سلولی در گره های لنفاوی زیر بغلی در سرطان های پستان، به عنوان یک آزمایش معمول انجام شود.

Evaluation of the Use of Cytokeratin Staining Technique in the Diagnosis of Micrometastasis to Axillary Lymph Nodes in Patients with Breast Cancer

*Z. Behdadipour, Ph.D. *,*
*M. Mokhtari, M.D. **,*
*P. Rajabi, M.D. ***,*
*M. Saberi, M.Sc. ****,*
**Assistant Professor of Histology,*
***Assistant Professor of Pathology,*
****Associate Professor of Pathology,*
*****Instructor of Histology,*
Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Correspondence:
Z. Behdadipour
Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medial Sciences, Isfahan, Iran
Tel: *+98-311-7922430*
Fax: *+98-311-7922464*
E-mail: *behdadipour@med.mui.ac.ir*

Background: Breast cancer is the most common cancer in women. Involvement of lymph nodes is the most important factor in the prognosis and treatment of breast cancer. Usual methods like hematoxylin-eosin staining for diagnosis of micrometastases are not precise, therefore other techniques that can diagnose micrometastasis, even in the early stages, is very useful. So, in this study we used intracytoplasmic antigens and an immunohistochemical method (cytokeratin staining) to detect metastatic cells in axillary lymph nodes. **Patients and Methods**: In a cross- sectional study, 82 women with breast cancer who were referred to Alzahra Hospital in Isfahan during 2001-2003 were selected using simple sampling method. The sections were prepared from the samples and hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining methods were done and the sections were studied by light microscopy. The results were analysed using Chi square (X^2) and Fisher's exact test and a p-value less than 0.05 was considered as significant. **Results**: Using hematoxylin-eosin and cytokeratin staining methods, it was shown that the relative frequency of micrometastases were 15.85% and 46.34%, respectively. **Conclusion**: In order to identify micrometastatic cells, the cytokeratin staining method is better than the usual hematoxylin-eosin method. Up to now, many studies have been done showing that there is a significant difference between the two methods. In this study similar results were obtained. Therefore, it can be concluded that cytokeratin staining method can help in the diagnosis of breast cancer more accurately. This, in turn, will help in the treatment strategies that are adopted and can be important in the prognosis of the disease.

Keywords: Breast cancer, Micrometastasis, Lymph node, Immunohistochemistry, Cytokeratin staining

منابع

[1]Bland KI, Vezeridis MP, Copeland EM: Breast. In: Schwarts SI, Shires GT, Spenser FC, eds. ***Principles of surgery***. 7th ed, Vol. 2. New York, USA: Mc Graw Hill, 1999: 533-57.
[2]Lester SC, Cotran RS: Breast. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. ***Robbin's pathologic basis of disease.*** 6th ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company, 1999: 1104- 5.

www.SID.ir

Archive of SID

[3]Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1998.***Ca Cancer J Clin*** 1998; 48 (1): 6-29.
[4]Elledge MR, Clark GM, Chamness GC, et al.: Tumor biologic factors and breast cancer prognosis among white Hispanics and black women in the United States. ***J Natl Cancer Inst*** 1994;86(9):705-12.
[5]Tavassoli F: General considerations. In: Tavassoli F, ed. ***Pathology of the breast***. 2nd ed. New York, USA: Mc Graw Hill, 1999: 27.
[٦]قناعی پ : تومورهای پستانی . بیماریهای پستان و درمان آنها. ۱۳۷۵، چاپ اول ، اصفهان . انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۲۲-۲۱.
[7]Rosai J: Breast Lymph nodes. In: ***Ackerman's surgical pathology.*** 8th ed, Vol.2. St. Louis, USA: Mosby, 1996: 1596, 1747-51.
[8]Wong SL, Chao C, Edwards MY, et al.: The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. ***Am J Surg*** 2001; 182(4): 330- 4.
[9]O'leary TJ: Standardization in immunohistochemistry. ***Appl Immunohistochem Mol Morphol*** 2001; 9(1) : 3-8.
[10]Pargaonkar SA, Beissner SR, Snyder S, Speights OV: Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. ***Arch Pathol Lab Med*** 2003;127(6):701-5.
[11]Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, et al.: Occult axillary lymph node metastases in breast cancer do matter: Results of 10-year survival analysis. ***Am J Surg Pathol*** 2002; 26(10):1286-95.
[12]Hainsworth PJ, Tjandra JJ, Stillwell RG, et al.: Detection and significance of occult metastases in node -negative breast cancer. ***Br J Surg*** 1993; 80:459-63.
[13]Hsaeh EC, Giuliano AE : Sentinel lymph node technique for staging of breast cancer. ***Oncologist*** 1998;3:165-70.

www.SID.ir