Original Paper

Diagnostic validity of BCL-2 in ganglion cell staining and its application in Hirschprung's disease diagnosis

Izadi B (MD)*[1], Kamkar N (MD)[2], Kanani M (MD)[2], Khazaei S (MSc)[3], Madani SH (MD)[1]

[1]Assistant Professor, Department of Pathplogy, Molecular Pathology Research Center, Imam Reza University Hospital, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran. [2]Resident of Pathplogy, Molecular Pathology Research Center, Imam Reza University Hospital, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran. [3]MSc of Pathology, Molecular Pathology Research Center, Imam Reza University Hospital, Kermanshah University of Medical Science, Kermanshah, Iran.

Abstract

Background and Objective: Hirschsprung's disease is a congenital disorder, characterized by the absence of ganglion cells in the intramural and submucosal plexus in distal parts of large bowel. Diagnosis is based on the histopathologic examination of hematoxilin and eosin stained sections. Due to diagnosis limitation by Hematoxylin and Eosin staining (H&E), this study was done to identify the ganglion cells by BCL-2 immunoreactivity and compared it with H&E staining.

Materials and Methods: In this laboratory study, paraffin blocks of 36 specimens demonstrating ganglion cells on original H&E stained sections and 35 specimens lacking ganglion cells on H&E staining, were selected. Recuts were stained by H&E and BCL-2 methods.

Results: Ganglion cells were observed in 36 cases by H&E staining but in BCL-2 staining ganglion cells were detected in 29 cases. In 35 cases reported negative for ganglion cells on H&E staining, ganglion cells were detected in 5 cases by BCL-2 method. Sensitivity, spesificity, positive and negative predictive values for BCL-2 method for diagnosis of hirshsprung's disease were 81%, 86%, 85% and 86% respectively.discordancy (positive BCL-2, negative H&E) was 14%.

Conclusion: Immunohistochemistry method using BCL-2 improve the accuracy of diagnosis in hirschsprung's disease, when accompanied with H&E staining, particulary for negative slides.

Keywords: Hirshsprung, Ganglion cell, BCL-2, Immunohistochemical study

*** Corresponding Author: Izadi B (MD), E-mail: bizadi@yahoo.com**

Received 3 April 2010 **Revised** 18 December 2010 **Accepted** 13 April 2011

This paper should be cited as: Izadi B, Kamkar N, Kanani M, Khazaei S, Madani SH. [Diagnostic validity of BCL-2 in ganglion cell staining and its application in Hirschprung's disease diagnosis]. J Gorgan Uni Med Sci. 2011; 13(3): 60-4. [Article in Persian]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / پاییز ۱۳۹۰ / دوره ۱۳ / شماره ۳ (پی در پی ۳۹) / صفحات ۶۰ تا ۶۴

تحقیقی

تعیین ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی BCL-2 در مشاهده سلول گانگلیونی و کاربرد آن در تشخیص بیماری هیرشپرونگ

دکتر بابک ایزدی*[1]، دکتر نداکامکار[2]، دکتر مالک کنانی[2]، صدیقه خزاعی[3]، دکتر سیدحمید مدنی[1]

۱- استادیار گروه پاتولوژی ، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی مرکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

۲- دستیار پاتولوژی ، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی مرکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی ، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی مرکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

چکیده

زمینه و هدف : *بیماری هیرشپرونگ یک بیماری مادرزادی است که بر مبنای فقدان سلول‌های گانلگیونی در شبکه عصبی زیرمخاط و لایه عضلانی تشخیص داده می‌شود. روش استاندارد تشخیص، رنگ‌آمیزی H&E است و با توجه به محدودیت‌های تشخیصی که برای مشاهده سلول گانگلیونی در آن وجود دارد؛ این مطالعه به منظور مقایسه روش H&E و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر BCL-2 انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه آزمایشگاهی ۷۱ نمونه بافتی بیماران مشکوک به بیماری هیروشپرونگ در بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا(ع) کرمانشاه طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۵ و ۲۰ نمونه مثبت بیماری هیرشپرونگ براساس روش H&E از سایر مراکز (تهران و کرمانشاه) طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۵ بررسی شدند. از ۳۶ نمونه که در برش‌های H&E سلول گانگلیونی در آن دیده شده بود و ۳۵نمونه فاقد سلول گانگلیونی در برش‌های رایج H&E، برش‌های جدید تهیه شد و تحت رنگ‌آمیزی H&E و BCL-2 قرار گرفت.*

یافته‌ها : *از ۳۶ مورد با سلول گانگلیونی مثبت در رنگ‌آمیزی H&E ، سلول گانگلیونی در ۲۹ مورد با نشانگر BCL-2 مشاهده شد و در ۷ مورد این سلول مشاهده نگردید. در ۳۵ موردی که با رنگ‌آمیزی H&E سلول گانگلیونی مشاهده نگردید؛ سلول گانگلیونی در ۵مورد با رنگ‌آمیزی BCL-2 مشاهده شد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با مارکر BCL2 به ترتیب ۸۱درصد، ۸۶درصد، ۸۵درصد و ۸۶درصد تعیین شد. عدم توافق (discordancy) رنگ‌آمیزی BCL-2 مثبت (یعنی یافتن سلول گانگلیونی) و H&E منفی (یعنی عدم مشاهده سلول گانگلیونی) ۱۴ درصد تعیین شد. تفاوت مشاهده شده از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.*

نتیجه‌گیری : *نتایج این مطالعه نشان داد که رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با BCL-2 برای یافتن سلول‌های گانگلیونی در موارد مشکوک به بیماری هیرشپرونگ از نظر علایم بالینی، نمی‌تواند جایگزین روش رایج H&E شود؛ اما استفاده از BCL-2 به عنوان یک روش تکمیلی، تعداد موارد منفی کاذب در یافتن سلول گانگلیونی را کاهش داده و در نتیجه از موارد تشخیص نادرست بیماری هیرشپرونگ می‌کاهد.*

کلید واژه‌ها : *هیرشپرونگ ، BCL-2 ، ایمونوهیستوشیمی ، سلول گانگلیونی ، هماتوکسیلین ائوزین*

---

* نویسنده مسؤول : دکتر بابک ایزدی ، پست الکترونیکی **bizadi@yahoo.com**

نشانی : کرمانشاه ، بلوار زکریای رازی ، مرکز آموزشی و درمانی امام رضا (ع) ، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی

تلفن ۴۲۸۳۳۹۲-۰۸۳۱ ، نمابر ۴۲۷۶۳۴۳

وصول مقاله : ۸۹/۱/۱۴ ، اصلاح نهایی : ۸۹/۹/۲۷ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۱/۲۴

مقدمه

هیرشپرونگ یا مگاکولون یک بیماری مادرزادی است که تقریباً یک در هر ۵۰۰۰ تولد زنده رخ می‌دهد و شایع‌ترین علت انسداد روده نوزادان می‌باشد (۱). این بیماری با مشاهده فقدان سلول‌های گانگلیونی پاراسمپاتیک در شبکه عصبی مایسنر و اوئرباخ در قطعه گرفتار تشخیص داده می‌شود (۱). بنابراین تشخیص درست بیماری وابسته به تعیین سلول‌های گانگلیونی با حساسیت و ویژگی بالاست. در حال حاضر استاندارد تشخیصی هیرشپرونگ رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین ائوزین (H&E) است (۱). ولی مشاهده سلول‌های گانگلیونی به‌خصوص در مورد نمونه‌های زیرمخاطی و یا سلول‌های نابالغ که کوچک‌تر هستند و هسته و سیتوپلاسم آنها هنوز ویژگی‌های تشخیصی یک سلول بالغ را به‌صورت کامل پیدا نکرده‌اند؛ در رنگ‌آمیزی رایج H&E سخت می‌گردد (۲و۳).

سلول‌های گانگلیونی در رنگ‌آمیزی رایج H&E ممکن است با سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست یا هیستیوسیت اشتباه شود (۴). از آنجا که درمان بیماری هیرشپرونگ، مستلزم یک عمل جراحی سنگین، برداشتن تمام یا قسمتی از روده است (۵)؛ تشخیص اشتباه این بیماری (یعنی ندیدن سلول گانلگیونی) می‌تواند عواقب غیرقابل جبرانی داشته باشد. تاکنون چندین نشانگر ایمنوهیستوشیمی برای تشخیص این سلول‌ها به‌کاررفته (۱۵-۶) و نتایج متناقضی در مورد آنها گزارش شده است. BCL-2 پروتئینی است که در جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) نقش داشته (۹) و در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در حال تکامل در جنین و در نوزادان و در سیستم عصبی بزرگسالان، وجود دارد. سیستم عصبی خودکار در دیواره روده هم با این نشانگر رنگ می‌گیرد. رنگ‌پذیری BCL-2 در سلول‌های گانگلیونی شبکه عصبی، به صورت سیتوپلاسمی است (۹). با توجه به رنگ‌آمیزی آسان آن (در مقایسه با نشانگرهای هسته‌ای)، در دسترس بودن و قیمت مناسب، به منظور مقایسه BCL-2 و رنگ‌آمیزی H&E در تشخیص سلول گانگلیونی در نمونه بافتی روده بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونگ انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی ۷۳ نمونه بافتی بیماران مشکوک به بیماری هیروشپرونگ براساس اطلاعات بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا(ع) کرمانشاه طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۵ و نیز برای بالا بردن دقت کار، تعداد ۲۰ نمونه مثبت بیماری هیرشپرونگ (یعنی نمونه‌ای که سلول گانگلیونی به روش H&E در آن دیده نشده است) از سایر مراکز (تهران و کرمانشاه)، انتخاب شد.

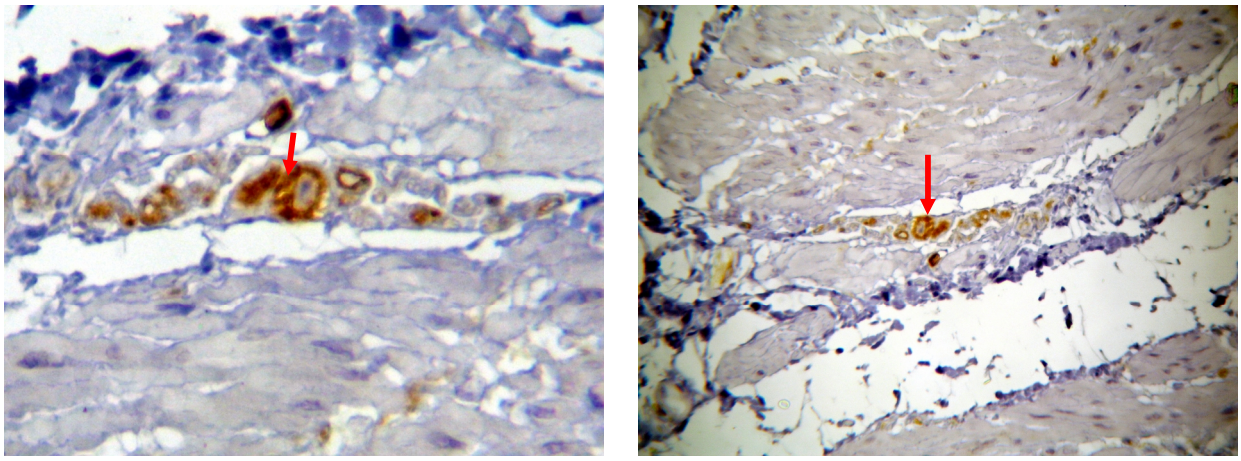
در این مطالعه از کلون ۱۲۴ آنتی‌بادی مونوکلونال BCL-2 استفاده شد. این آنتی‌بادی مونوکلونال نشانگر داخل سیتوپلاسمی فوق را مشخص می‌کند. از بلوک‌های پارافینی نمونه‌های مذکور، یک برش سه میکرونی تهیه و با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی BCL-2 (clon124 code:N1587) طبق دستورالعمل شرکت Dako رنگ‌آمیزی گردید. نمونه تومورگانگلیونوروما (یک تومور عصبی که در آن تعداد زیادی سلول گانگلیونی وجود دارد.) به عنوان کنترل مثبت و نمونه بافت همبندی طبیعی به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج رنگ‌آمیزی به روش H&E همچنین نتایج رنگ‌آمیزی BCL-2 توسط دوپاتولوژیست جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری STATA و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. ضریب اطمینان مطالعه ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۷۳ مورد نمونه بافتی، از بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونگ طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۵ جمع‌آوری گردید و ۲ نمونه به دلیل ناکافی بودن بافت حذف شد. ۷۱نمونه باقی‌مانده به روش H&E و همچنین برای نشانگر BCL-2 به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند.

با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E در ۳۵ مورد فقدان سلول گانگلیونی و در ۳۶ مورد وجود آن مشخص گردید.

در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر BCL-2 از ۳۵ موردی که فقدان سلول گانگلیونی توسط رنگ‌آمیزی H&E گزارش شده بود؛ در۵ مورد سلول گانگلیونی مشاهده گردید. همچنین از ۳۶ مورد با سلول گانگلیونی مثبت گزارش شده با



تصویر ۱ : بروز سیتوپلاسمی نشانگر BCL-2 در سلول گانگلیونی. بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر و ۴۰۰ برابر

استفاده از روش H&E ؛ در ۷ مورد سلول گانگلیونی مشاهده نشد و در ۲۹ مورد مشاهده گردید (جدول یک). برهمین اساس، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی رنگ‌آمیزی با نشانگر BCL-2 در مقایسه با H&E به عنوان روش استاندارد تشخیصی به ترتیب ۸۱ درصد، ۸۶ درصد، ۸۵ درصد و ۸۶ درصد تعیین گردید.

جدول ۱ : مقایسه رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی BCL-2 با رنگ‌آمیزی رایج H&E برای تشخیص بیماری هیرشپرونگ

تعداد نمونه	H&E	BCL-2
۲۹	+	+
۷	+	−
۳۰	−	−
۵	−	+

طبق نتایج آنالیز فوق، رنگ‌آمیزی نشانگر BCL-2 در ۱۴درصدموارد، علی‌رغم منفی گزارش شدن سلول گانگلیونی در مطالعه H&E در رنگ‌آمیزی IHC با نشانگر ذکر شده، سلول گانگلیونی مشاهده و بیماری هیرشپرونگ رد شد. تفاوت مشاهده شده در نتایج از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

بحث

در مطالعه حاضر رنگ‌آمیزی BCL-2 نسبت به روش رایج رنگ‌آمیزی H&E در تشخیص سلول‌های گانگلیونی در نمونه‌های بافتی بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونگ، از حساسیت کمتری برخوردار است؛ ولی اختصاصی‌تر از آن می‌باشد. با این حال تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در مطالعه Wester و همکاران در سال ۱۹۹۹ در سوئد، نمونه بافتی کولون سالم ۵ کودک و ۲ بزرگسال و نمونه بافتی قطعات گرفتار و سالم در ۱۱ بیمار مبتلا به هیرشپرونگ از نظر نشانگرهای BCL-2 و NSE بررسی شد. سلول‌های گانگلیونی موجود در تمام نمونه‌ها با BCL-2 رنگ گرفت و رنگ‌پذیری رشته‌های عصبی در مقایسه با NSE کمتر بود. در نمونه‌های فاقد سلول گانگلیونی (یعنی ۱۱ مورد هیرشپرونگ در قطعات گرفتار) رنگ‌پذیری با BCL-2 دیده نشد و نتیجه‌گیری شد که BCL-2 نشانگر مناسبی برای تشخیص سلول گانگلیونی و رد هیرشپرونگ در تمام سنین است (۹).

در مطالعه معمارزاده و همکاران در اصفهان، چندین نشانگر ایمونوهیستوشیمی از جمله BCL-2 در مقایسه با H&E در ۴۹نمونه بیمار مشکوک به بیماری هیرشپرونگ از نظر بالینی مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت. در مورد نشانگر BCL-2 (طبق دستورالعمل رنگ‌آمیزی شرکت DAKO) نتیجه‌گیری شد که چون علاوه بر سلول گانگلیونی پس‌زمینه هم رنگ می‌گیرد؛ لذا BCL-2 نشانگر مناسبی برای شناسایی سلول گانگلیونی به شمار نمی‌رود (۱۰).

یافتن سلول‌های گانگلیونی در موارد مثبت، در نمونه‌های رنگ شده با BCL-2 به دلیل تفاوت رنگ با زمینه بافت، نسبت به رنگ‌آمیزی معمول H&E راحت‌تر است. هرچند فقط در ۱۴ درصد موارد با مشاهده سلول گانگلیونی در رنگ‌آمیزی BCL-2 ، تشخیص کاذب این بیماری رد شد و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود؛ ولی به دلیل اهمیت تشخیص صحیح بیماری و جلوگیری از عوارض جبران‌ناپذیر

عمل جراحی در مواردی با تشخیص اشتباه؛ به‌نظر می‌رسد که ارزش رنگ‌آمیزی BCL-2 حتی در رد یک مورد تشخیص نادرست بیماری هیرشپرونگ، برای پزشکان بالینی و بیمار دارای اهمیت باشد. لذا در مواردی که علی‌رغم کافی بودن نمونه در رنگ‌آمیزی H&E، سلول گانگلیونی یافت نمی‌شود؛ بررسی ایمونوهیستوشیمی با رنگ BCL-2 می‌تواند به عنوان یک روش کمکی مناسب برای تایید تشخیص مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با BCL-2 برای یافتن سلول‌های گانگلیونی در موارد مشکوک به بیماری هیرشپرونگ از نظر علایم بالینی، نمی‌تواند جایگزین روش رایج H&E شود؛ اما استفاده از BCL-2 به عنوان یک روش تکمیلی، تعداد موارد منفی کاذب در یافتن سلول گانگلیونی را کاهش داده و در نتیجه از موارد تشخیص نادرست بیماری هیرشپرونگ و متعاقب آن، یک عمل جراحی سنگین یعنی برداشتن تمام یا قسمتی از روده، می‌کاهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی (شماره ۸۸۰۰۱) دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و پایان‌نامه دستیار پاتولوژی خانم دکتر ندا کامکار بود. نویسندگان این مقاله از خانم شهین فلاحی (کارمند بخش پاتولوژی) و اعضای مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی مرکز آموزشی درمانی امام رضا (ع) دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و اساتید و کارکنان مرکز طبی کودکان دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Vol II. 9th. New York: Mosby. 2004; pp: 777-9.

2. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th. Philadelphia: Saunders Company. 2007; pp: 1565-7.

3. Martucciello G. Hirschsprung's disease, one of the most difficult diagnoses in pediatric surgery: a review of the problems from clinical practice to the bench. Eur J Pediatr Surg. 2008 Jun; 18(3):140-9.

4. Stocker JT, Dehner LP. Pediatric Pathology. 2nd. New York: Lippincott Williams & Wilkins. 2001; pp: 649-53.

5. Boman F, Corsois L, Paraf F. [Hirschsprung's disease: practical considerations]. Ann Pathol. 2004 Dec;24(6):486-98. [Article in French]

6. Constipation Guideline Committee of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Evaluation and treatment of constipation in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006 Sep;43(3):e1-13.

7. Karim S, Hession C, Marconi S, Gang DL, Otis CN. The identification of ganglion cells in Hirschsprung disease by the immunohistochemical detection of ret oncoprotein. Am J Clin Pathol. 2006 Jul;126(1):49-54.

8. Torabi Zadeh Zh, Naghsh Var F, Emadian O, Alam AR, Khalilian AR, Peivandi N. [Determination of diagnostic validity of neuron-specific enolase staining on mucosal-submucosal rectal biopsies in patients suspected of having Hirschprung's disease and allied disorders]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2006; 16(5):30-6. [Article in Persian]

9. Wester T, Olsson Y, Olsen L. Expression of bcl-2 in enteric neurons in normal human bowel and Hirschsprung disease.Arch Pathol Lab Med. 1999 Dec;123(12):1264-8.

10. Memarzadeh M, Talebi A, Edalaty M, Hosseinpour M, Vahidi N. Hirschsprung's disease diagnosis: Comparison of immunohistochemical, hematoxilin and eosin staining. J Indian Assoc Pediatr Surg. 2009 Apr;14(2):59-62.

11. Al-Sohaibani M O, Anim JT, Khwaja S. Immunostaining in Hirschsprung's Disease: Al-Khobar Experience. Ann Saudi Med. 1990; 10(4):434-8.

12. Ewa DK, Debek W, Chyczewski L. Clinical application of morphological methods for identification of intestinal nervous system elements. Case Rep Clin Pract Rev. 2003;4(4):346-55.

13. MacKenzie JM, Dixon MF. An immunohistochemical study of the enteric neural plexi in Hirschsprung's disease. Histopathology. 1987 Oct;11(10):1055-66.

14. Song Y, Li JC, Li MJ. [Bcl-2 expression in enteric neurons of Hirschsprung's disease and its significance]. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao. 2002 Jun;35(2):155-8. [Article In Chinese]

15. Park SH, Min H, Chi JG, Park KW, Yang HR, Seo JK. Immunohistochemical studies of pediatric intestinal pseudo-obstruction: bcl2, a valuable biomarker to detect immature enteric ganglion cells. Am J Surg Pathol. 2005 Aug;29(8):1017-24.