

## مقایسه نتایج رنگ آمیزی آهن در نمونه برداری مغزاستخوان با روشهای آسپیراسیون و بیوپسی سوزنی

دکتر رامین آذر هوش\*

### چکیده:

مغزاستخوان را می توان حتی در بیماران سرپائی که به کلینیک ها مراجعه می کنند، با کمترین خطر، نمونه برداری کرد. نمونه برداری معمولاً به دو روش: آسپیراسیون و بیوپسی صورت می گیرد. آسپیراسیون مغز استخوان از بسیاری جهات، همچون: سهولت و ارزش تشخیصی، در اکثر بیماری های خونی، بیش از بیوپسی کاربرد یافته است.

در شرایط خاصی انجام آسپیراسیون برای مقاصد تشخیصی امکان پذیر نیست؛ لذا بایستی به تنهایی در مورد نمونه بیوپسی به قضاوت پرداخت. از طرفی ارزیابی ذخایر آهن مغزاستخوان، در تشخیص پاره ای از بیماری های هماتولوژیک مثل: انواع آنمی ها، اهمیت ویژه ای دارد؛ بطوری که ارزیابی ذخیره های آهن و سیدروبلاست ها، امکان دسته بندی کم خونی های میکروسیتی را به صورت فقر آهن، کم خونی بیماری مزمن و کم خونی سیدروبلاستی فراهم می آورد.

چنانچه نتوان مغزاستخوان را آسپیره کرد (Dry Tap) انجام بیوپسی برای ارزیابی های فوق تنها راه موجود می باشد.

مطالعه انجام گرفته بر روی ۷۵ نمونه آسپیراسیون و بیوپسی همزمان مغزاستخوان نشان داده است که حساسیت روش رنگ آمیزی آهن در بیوپسی نسبت به رنگ آمیزی آهن در آسپیراسیون به عنوان آزمون طلایی، ۸۸٪، ویژگی آزمون معادل ۶۴٪، ارزش اخباری مثبت آن ۵۶/۵٪ و ارزش اخباری منفی آزمون مذکور ۹۱٪ می باشد و استفاده از آن می تواند در موارد خاصی - که انجام آسپیراسیون با موفقیت همراه نبوده است - اطلاعات سودبخشی را در اختیارمان قرار دهد.

واژه های کلیدی: مغزاستخوان، بیوپسی، آسپیراسیون، آهن قابل رنگ آمیزی

## مقدمه:

باشد، در مجاورت بخارات فرمالین بمدت ۱۰ دقیقه ثابت کرده و بعد در محلول تازه تهیه شده محتوی ۰/۵٪ فروسیانید پتاسیم و ۰/۷۵٪ اسید هیدروکلریک غوطه‌ور می‌کنند. بعداً با رنگ nuclear fast red اقدام به رنگ‌آمیزی مخالف می‌نمایند.

در مورد برش‌های بافتی می‌توان به همین گونه عمل نمود. هنگامی که هموسیدرین یا فریتین وجود داشته باشد، واکنش آبی پروس (Prussian blue reaction) اتفاق می‌افتد که به شکل گرانول‌های آبی رنگ جلب توجه می‌نماید. در این مرحله نتایج را به صورت عددی گزارش می‌کنند. آهن ذخیره‌ای که در ماکروفاژها قرار دارد، فقط در ذرات خاکستری گسترش قابل ارزیابی می‌باشد.

گزارش نتایج در بالغین به صورت زیر انجام می‌گیرد:

۲+ به معنای طبیعی بودن؛ ۳+ به معنی افزایش مختصر؛ ۴+ به معنای افزایش متوسط و ۵+ به معنای افزایش زیاد است؛ ۱+ نشانه کاهش ذخایر آهن در مغزاستخوان و (۰) نشانه عدم وجود این ذخایر است. محدوده بین طبیعی، با مختصری افزایش یا کاهش در ذخیره آهن، به خوبی قابل تشخیص نمی‌باشد. به این دلیل، ذخایر مغزاستخوان را به صورت فقدان یا بسیار کاهش یافته، موجود یا نرمال، یا افزایش یافته نیز توصیف نموده‌اند (۵ و ۱).

در تحقیق صورت گرفته از سوی ما، ذخایر آهن

یکی از روش‌های رایج تشخیص بیماری‌های خونی، بیوپسی یا آسپیراسیون مغزاستخوان می‌باشد.

مغزاستخوان بالغین، به طور تخمینی ۱۳۰۰ تا ۱۵۰۰ گرم بوده و قادر است در مدت چند روز و گاهی چند ساعت، کاملاً تغییر شکل دهد. علی‌الاصول این تغییر شکل سریع، تمام استخوان‌های بدن را در برمی‌گیرد، لذا با برداشتن نمونه کوچکی از این ارگان وسیع، می‌توان به خوبی وضعیت کلی آن را معلوم کرد (۳ و ۲ و ۱).

گسترش‌های آسپیراسیونی مغزاستخوان، همانند گسترش‌های خون محیطی تهیه می‌شوند. بهترین ماده برای تهیه گسترش‌های خوب از مغزاستخوان، ذرات خاکستری (gray particles) مغزاستخوان است که با چشم غیر مسلح دیده شده و در امتحان میکروسکوپی اسمیرهای رنگ شده، وجه تشخیصی (land mark) محسوب می‌شوند (۴ و ۳).

برای تهیه برش‌های بافتی از بیوپسی سوزنی مغزاستخوان، آن را ساعت‌ها درون محلول «استیک زنکر» قرار داده، سپس بافت را به روش معمول در پارافین قالب‌گیری کرده و سرانجام، برش‌هایی به قطر ۴ میکرون از آن تهیه می‌کنند (۱).

برای رؤیت ذرات آهن، از رنگ‌آمیزی پرل (Perl's test) استفاده می‌شود. گسترش‌های مغزاستخوان را که واجد ذرات خاکستری مذکور

۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه ثابت (fix) شده و بعداً با متد پرل رنگ آمیزی گردیدند. نمونه‌های بیوپسی سوزنی در فرمالین ۱۰٪ به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردیدند که پس از کامل شدن فیکساسیون بافت، با محلول دکلسیفیه کننده (کلسیم زدا) شامل اسید نیتریک ۵٪ بمدت ۵-۴ ساعت کلسیم زدایی و نرم شده و برای بلوک کردن به روش بلوک پارافینی آماده شدند. مقاطع هیستولوژی به ضخامت ۴ الی ۵ میکرون تهیه شده و با روش پرل رنگ آمیزی آهن گردیدند.

برای پاساژ بافت‌ها از دستگاه Tissue processor ساخت کارخانه SAKURA ژاپن مدل RH - 12 EP2 استفاده گردید و برای تهیه مقاطع پارافینی از بافت، از دستگاه میکروتوم Leitz مدل 1512 ساخت آلمان استفاده شد.

هر نمونه، شامل اسمیر و برش‌های بافتی، با بزرگ نمائی ۴۰۰ میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند. برای اجتناب از اشتباه و بروز نتایج مثبت کاذب، ذرات رسوب آبی رنگ داخل سلولی مورد توجه بودند. هم آهن ماکروفاژها و هم آهن سیدروبلاست‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. دو مشاهده کننده نیز در مطالعه حاضر مشارکت داشتند و اطلاعات بالینی در حین مطالعه لام‌ها در اختیار نبوده است. نتایج به دست آمده، بر حسب تقسیم‌بندی کتاب اصول هماتولوژی هافمن (۸) ثبت گردید.

۱ - یک سلول آهن مثبت، تقریباً در هر میدان

به شکل موجود (present) که در هر میدان میکروسکپی قوی (x 40) یک گرانول آبی رنگ آهن وجود دارد؛ یا به صورت افزایش یافته - که بیشتر از دو گرانول آهن در هر میدان وجود دارد؛ کاهش یافته که کمتر از یک گرانول آهن در هر میدان دیده می‌شود و یا فقدان (Absence) که نبودن گرانول آهن می‌باشد، توصیف گردیده است (۴).

آهن ذخیره‌ای مغزاستخوان، در ماکروفاژها به صورت گرانول‌های آبی رنگ دیده می‌شود. در حالت طبیعی تعداد کمی گرانول آبی رنگ در ماکروفاژها دیده می‌شود؛ در فقر آهن، این گرانول‌ها وجود نداشته؛ یا ندرتاً به چشم می‌خورد. (۱)

### روش تحقیق:

از ۷۵ بیمار مراجعه کننده به مراکز درمانی، بطور تصادفی، ۷۵ نمونه آسپیراسیون و بیوپسی مغزاستخوان، انتخاب شد. در این انتخاب، به تشخیص نهایی توجهی نشان داده نشد، بلکه، بیماران، با دلایل مختلفی، (اعم از کم خونی‌ها، بیماری‌های نئوپلاستیک اولیه و ثانویه و...) به طور همزمان، مورد آسپیراسیون و بیوپسی مغزاستخوان، قرار گرفتند.

برش‌های بافتی، پس از تهیه مقطع از بلوک‌های موجود، با روش پرل (perl)، رنگ آمیزی آهن شدند؛ اسمیرهای مغزاستخوان که دارای پارتیکل بوده و به طریق مناسبی تهیه شده بودند، نیز با روش مذکور، رنگ آمیزی و آماده شدند. اسمیرها با بخار فرمالین

است. در ۳۵ مورد (۷/۴۶٪) میان رنگ‌آمیزی آهن گسترش و برش‌های بافتی مربوطه اختلاف وجود نداشته است (جدول شماره ۲ و ۱).  
برای تعیین اعتبار این آزمایش نسبت به روش اسپیراسیون از دو جزء حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) استفاده شده است.  
طبق تعریف، حساسیت عبارت است از: قدرت تشخیص صحیح کسانی که واقعاً بیمار می‌باشند با احتمال این که در شخص مبتلا به بیماری خاص، نتیجه آزمایش مثبت باشد.

ویژگی عبارت است از: قدرت تشخیص صحیح کسانی که بیمار نمی‌باشند، با احتمال این که در شخصی که مبتلا به یک بیماری خاص نیست، نتیجه آزمایش منفی باشد.

در موضوع مورد بررسی، وجود یا عدم وجود آهن در نمونه‌های بیوپسی، آزمون مثبت یا منفی فرض گردیده و تست اصلی (طلایی) ما وجود یا فقدان آهن در نمونه‌های اسپیراسیون می‌باشد. در کنار تعیین میزان حساسیت و ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی آزمون فوق‌الذکر نیز مورد بررسی قرار گرفت. ارزش اخباری مثبت، احتمال ابتلا به بیماری خاص را در شخصی که نتیجه آزمایش او مثبت است، بیان می‌کند و ارزش اخباری منفی، این احتمال را که شخصی که نتیجه آزمایش او منفی است، مبتلا به بیماری خاصی نباشد بیان می‌نماید. (۶ و ۷)

میکروسکوپی ( $\times 400$ ) = موجود (present)

۲ - بیش از دو سلول آهن مثبت در هر میدان

( $\times 400$ ) = افزایش یافته (increased)

۳ - کمتر از یک سلول آهن مثبت، بطور میانگین

، در هر میدان ( $\times 400$ ) = کاهش یافته (decreased)

۴ - عدم رویت سلول آهن مثبت در میادین

مختلف میکروسکوپی = فقدان (absent)

### نتایج:

در آهن قابل رنگ‌آمیزی نمونه‌های اسپیراسیون و برش‌های بافت‌شناسی مغزاستخوان ۴۰ نفر (۳/۵۳٪) از ۷۵ بیمار اختلاف قابل توجهی مشاهده شد. در ۳ مورد (۴٪) از ۴۰ مورد فوق‌الذکر، آهن قابل رنگ‌آمیزی در بیوپسی‌ها بیش از اسمیر بوده است؛ ولی در ۳۷ مورد (۳/۴۹٪) دیگر، آهن قابل رنگ‌آمیزی اسمیر بیش از برش‌های بافتی بوده است. در ۱۹ مورد (۲۵٪)، برش‌های بیوپسی سوزنی، اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نسبت به اسمیرهای مربوطه نشان داده‌اند. در کلیه موارد فوق، آهن قابل رنگ‌آمیزی، ۲ درجه یا بیشتر تفاوت نشان می‌دادند؛ به طوری که همواره میزان آهن اسمیرها بیش از بیوپسی‌های مربوطه بوده است. در ۱۷ مورد (۶/۲۲٪) از بیوپسی‌های سوزنی، آهن قابل رنگ‌آمیزی مشاهده نشد؛ در حالی که در گسترش‌های مربوط به آن بیمار، آهن وجود داشته

بر اساس یافته های میکروسکوپی نتایج ذیل بدست آمده است :

جدول ۱ - نتایج رنگ آمیزی آهن در آسپیراسیون و بیوپسی مغزاستخوان ۷۵ بیمار

آهن وجود دارد	آهن وجود ندارد	آسپیراسیون بیوپسی
مثبت کاذب (۱۷)	مثبت حقیقی (۲۲)	آهن در بیوپسی وجود ندارد. (آزمون مثبت)
منفی حقیقی (۳۰)	منفی کاذب (۳)	آهن در بیوپسی وجود دارد. (آزمون منفی)

ارزش اخباری مثبت معادل ۵/۵۶٪ به دست آمد که به عبارتی، چنانچه آزمون اصلی ما، روش آسپیراسیون باشد، از کل موارد مثبت، مثبت های نتیجه آزمون بیوپسی ۵/۵۶٪ می باشد و ارزش اخباری منفی معادل ۹۱٪ تعیین گردید. به عبارتی، چنانچه آزمون اصلی ما، روش آسپیراسیون باشد، از کل موارد منفی، منفی های نتیجه تست بیوپسی، ۹۱٪ می باشد.

مقدار حساسیت مطالعه معادل ۸۸٪ به دست آمد. به عبارتی چنانچه آزمون اصلی ما، روش آسپیراسیون باشد، حساسیت روش بیوپسی، نسبت به آن ۸۸٪ می باشد. مقدار ویژگی معادل ۶۴٪ تعیین گردید. به عبارتی، چنانچه آزمون اصلی ما، روش آسپیراسیون باشد، ویژگی روش بیوپسی نسبت به آن ۶۴٪ می باشد.

جدول ۲ - خلاصه نتایج بدست آمده از بررسی مقایسه ای رنگ آمیزی آهن در اسمیر و بیوپسی مغزاستخوان

ردیف		نفر	درصد
۱	کل نمونه	۷۵	٪۱۰۰
۲	اختلاف بین نمونه ها	۴۰	٪۵۳/۳
۳	آهن بیوپسی < آسپیراسیون	۳	٪۴
۴	آهن آسپیراسیون < بیوپسی	۳۷	٪۴۹/۳
۵	اختلاف بیش از ۲+	۱۹	٪۲۵
۶	در بیوپسی آهن منفی و در آسپیراسیون آهن مثبت	۱۷	٪۲۲/۶
۷	عدم اختلاف	۳۵	٪۴۶/۷

## بحث:

آهن مشاهده شده در نمونه‌ها، آهن حقیقی بافت بوده و آرتیفکت نمی‌باشد؛ ولی نمونه آسپیره شده نسبت به بیوپسی با حساسیت و دقت بیشتری ذخایر آهن مغزاستخوان را منعکس می‌سازد. این مسأله ممکن است از این نظر ارزش داشته باشد که ارزیابی مغزاستخوان از نظر میزان آهن ممکن است بین نمونه‌های بدست آمده از بیوپسی سوزنی و نمونه آسپیره شده، دارای اختلاف مشخص و معنی دار بوده باشد و این خود می‌تواند منجر به بروز خطا در تشخیص شود. (۸)

از دست رفتن آهن در حین روند دکلسیفیکاسیون می‌تواند دلیل اصلی از بین رفتن آهن قابل رنگ‌آمیزی در نمونه‌های بیوپسی باشد.

استفاده از بیوپسی برای به‌دست آوردن نمونه‌های مغزاستخوان در سال‌های گذشته افزایش یافته است. این روش عموماً مطالعات آسپیراسیون را کامل می‌کند؛ ولی جای آن را نمی‌گیرد. اما در بسیاری از موارد بین روش‌ها همپوشانی وجود دارد؛ لذا مطابق با منابع و مراجع متعددی که مورد بررسی قرار گرفتند، ضروری است جهت انعکاس صحیح و دقیق ذخایر آهن بدن (ولذا تشخیص نهایی آنمی‌های فقر آهن و سیدروبلاستیک) از آسپیراسیون مغزاستخوان استفاده شود. با این وجود بیوپسی مغزاستخوان نیز در موارد بسیاری اطلاعات تکمیلی با ارزش و سودمندی در خصوص ذخایر آهن ارائه نماید؛ خصوصاً در مواقعی که نمونه آسپیراسیون در دسترس پاتولوژیست نباشد (۷).

## REFERENCES:

- 1-Henry J, Bernard M.D. Clinical and diagnosis by laboratory methods. 1996. chapter 25; P: 612-613.
  - 2-Issenbacher, Braunwald, Wilson. Harrison's Principles of internal medicine. 1997; Vol 2. P:1722.
  - 3-Smith, Bennett, Wyngaardel. Cecil textbook of medicine. 1995; Vol 1, P:817.
  - 4-Ronald H, Edwar J.B, Bruce F. Hematology : Basic Principles and Practice.1991. capter 158; P:1805-1806.
  - 5-SirJone V.D, Lewis S.M. Practical hematology.1984 chapter 6; P:108-109.
- ۶ - کراوس، جان. ترجمه دکتر فرهادی، محمد. بیوپسی مغزاستخوان. دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۶۷.

۷ - عرب علیدوستی، علیرضا. بررسی نتایج رنگ‌آمیزی آهن در نمونه برداری مغزاستخوان. پایان نامه دوره دکتری پزشکی، رفسنجان: دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان: دانشکده پزشکی، ۱۳۷۵.

8-Kraus J, Brabaker R, Kaplan D. Comparision of stainable Iron in Aspirated and Needle Biopsy Specimen of Bone Marrow. American Journal of Clinical Pathology.1979; 72 : 68.