تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

تشخیص سلول های بدخیم در مایعات سروزی بااستفاده از یک پانل آنتی بادی های منو کلونال سیتوکراتین وآنتی ژن غشا اپیتلیالی وآنتی ژن کارسینو امبریونیک

وحیده کاظمی نژاد
استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

رامین آذرهوش
دانشیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: وحیده کاظمی نژاد

پست الکترونیک: vahidehkazeminejad@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۱۳۷۱۵۷۵۳

آدرس: دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت:۹۱/۸/۷
ویرایش پایانی:۹۱/۱۱/۲٤
پذیرش:۹۱/۱۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: *تشخیص سلول های بدخیم و تعیین نوع بد خیمی در مایعات سروزی بسیار حائز اهمیت است. هدف اصلی این مطالعه افتراق بین سلول های مزوتلیال واکنشی وسلول های بدخیم و نوع سلول های تومری در مایعات با کمک تومور نشانگرهای CK,EMA, CEA بود.*

روش بررسی: *سیتولوژی۴۰ مایع سروزی (۱۵ مورد بدخیم و۲۵موردمشکوک به بدخیمی بر اساس یافته های سیتولوژی) ارسالی به بخش پاتولوژی بیمارستان ۵ آذر گرگان به کمک سه نشانگر CEA, EMA, CK به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ آمیزی انجام گردید.*

یافته ها: *از ۱۵ مورد بدخیم، ۱۳ مورد برای هر سه نشانگر مثبت بودندو در ۲ مورد نیز تنها برای CEA منفی بود.در ۲۵ مورد مشکوک به بدخیمی ۱۵مورد مثبت قوی برای EMA و۶ مورد به طور ضعیف مثبت و۴ موردمنفی بود. از ۲۵ مورد مشکوک به بدخیمی۱۵ مورد مثبت قوی برای CK و۵ مورد به طور ضعیف مثبت بود و۵ مورد نیز منفی شد. در ۲۵ مورد مشکوک برای CEA ۵ مورد مثبت قوی، ۵ مورد مثبت ضعیف و۱۵ مورد نیزمنفی شدند.*

نتیجه گیری: *۸۷/۵ درصد از مایعات بدخیم برای نشانگرCK و۹۰ درصد برای نشانگرEMA مثبت بود. در این تحقیق مشخص شد که CK و EMA نشانگرهای اپیتلیالی قابل اعتماد در افتراق سلول های کارسینومی از سلول های مزوتلیالی واکنشی هستند. در ۱۰ (۴۰٪) نمونه مشکوک به آدنوکارسینوم نشانگر CEA مثبت بودکه نشان می دهد این نشانگر مرجع مهمی برای تشخیص مایعات سروزی بدخیم و مشکوک به آدنو کارسینوم می باشد.*

واژه های کلیدی: *آنتی بادی های منو کلونال، سیتوکراتین(CK)، آنتی ژن غشا اپیتلیالی(EMA)، آنتی ژن کارسینوامبریونیک (CEA)، ایمنوسیتوشیمی*

آدرس مقاله:
کاظمی نژاد و، آذرهوش ر" تشخیص سلول های بدخیم در مایعات سروزی بااستفاده از یک پانل آنتی بادی های منو کلونال سیتوکراتین، آنتی ژن غشا اپیتلیالی وآنتی ژن کارسینو امبریونیک" مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان۱۳۹۲ دوره هفتم(شماره۴): ۴۱-۴۶

مقدمه

برخی از مایعات سروزی منشا بدخیمی دارند لذا تعیین اتیولوژی در انجام اقدامات درمانی موثر و یافتن منشاء بدخیمی اهمیت زیادتری می یابد. تشخیص سلول های مزوتلیال از ماکروفاژها و سلول های کارسینوم متاستاتیک در مایعات سروزی بسیار دشوار است. امتحان سیتولوژیک مایعات سروزی برای تشخیص سرطان های درگیرکننده فضاهای جنب و صفاق یا پریکارد انجام می گردد. حدود ۷۵ درصد تومورهای بدخیم در پلور کارسینوم های متاستاتیک هستند(۱). یک مایع پلوری بدخیم اولین شاهد حضور سرطان در ۴۶ درصد بیماران می باشد. شایع ترین بدخیمی ها همچون تومورهای ریه(۳۳٪) پستان(۲۰/۹٪) و دستگاه گوارش(۷/۳٪) به مایعات سروزی بیشترین متاستازرا می دهند(۲)که بیشتر از نوع آدنوکارسینوما می باشند. سلول های مزوتلیال، ماکروفاژها و سلول های کارسینوم متاستاتیک می توانند تنوع وسیعی در شکل داشته باشندکه منجر به افتراق دشوار بین این سه نوع سلول در بعضی موارد می گردد. اغلب وقتی که سلول های مزوتلیال آتیپیک یا واکنشی در نمونه سیتولوژی با سلول های تومورال مخلوط می شوند استفاده از نشانگر های ایمونوهیستوشیمی می تواند به افتراق آنها کمک کند. برای اجتناب از تشخیص نادرست باید تفسیر واکنش ایمنوهیستوشیمی در هر سلول بر مبنای تجزیه و تحلیل سیتولوژی به روش مرسوم انجام شود. سیتوکراتین (CK) دسته ای از پروتئین های محلول در آب با وزن ملکولی بین ۴۰-۷۰ کیلودالتون است که اسکلت سلولی سلول های اپیتلیال را تشکیل می دهد و در صورت مثبت بودن سلول برای این نشانگر، الگوی رنگ آمیزی سلول سیتوپلاسمی است. آنتی ژن غشاء اپیتلیالی (EMA) ترکیبی پروتئینی است که در انواع اپیتلیوم های طبیعی و بدخیمی ها حضور دارد و آنتی بادی ضد آن به طور گسترده ای در تعداد زیادی از بدخیم ها اغلب در کنار دیگر آنتی بادی ها مورد استفاده قرار می گیرند و الگوی رنگ آمیزی سلولی برای این نشانگر، سیتوپلاسمی و غشایی است. آنتی ژن کارسینوآمبریونیک (CEA) یک گلیکوپروتئین انکوفتال است که به طور طبیعی در دوران زندگی جنینی دیده می شود و به ویژه با کارسینوم های مجاری مجرای گوارش نظیر آدنوکارسینوم کولون ، معده و پانکرس همراه است. بعلاوه CEA در آدنوکارسینوم ریه و پستان یافت می شود و الگوی رنگ آمیزی سلول برای این نشانگر نیز سیتوپلاسمی و غشایی است. در مایعات سروزی بدخیم آدنو کارسینوما شایع ترین بدخیمی است که تشخیص داده می شود و به دنبال آن کارسینوم تمایز نیافته، لنفوم ها و لوسمی ها قرار دارند. برای تشخیص نوع تومور انجام ایمونوهیستو شیمی یک روش اختصاصی وحساس می باشد. مطالعات زیادی یافتن سلول های مثبت برای CEA را در افتراق کارسینوم متاستاتیک از سلول های مزوتلیال، یافته ای تشخیصی می دانند چون سلول های مزوتلیال چه خوش خیم و چه بدخیم آنرا بیان نمی کنند. نشانگر EMA ممکن است در سلول های مزوتلیال مثبت ضعیف و به صورت محیطی در سلول رنگ بگیرند اما سلول های آدنوکارسینومای متاستاتیک به صورت قوی و منتشر درسیتوپلاسم رنگ می پذیرند. منفی شدن EMA وCEA آدنوکارسینوما را رد نمی کند زیرا ممکن است به علت از دست دادن این آنتی ژن ها در سلول های تومری این نتایج به دست بیاید(۳). نتایج برخی از مطالعات بیانگر این است که ۹۸ درصد مایعات سروزی بدخیم بدون توجه به نوع بدخیمی با EMA واکنش نشان می دهند و همچنین ۱۴ درصد مایعات سروزی خوش خیم با EMA مثبت می شوند(۴). همه اسمیرهای حاوی سلول های آدنو کارسینومی که با اتانول ثابت شده اند برایCEA واکنش نشان می دهند(۵). سیتوکراتین ها در سلول های اپیتلیال بیان می شوند و برای تشخیص ماهیت کارسینومی یک ضایعه متاستاتیک با تمایز بد معمولا اولین قدم تشخیصی رنگ آمیزی برای سیتوکراتین هاست(۶). فقدان رنگ پذیری برای CEA و رنگ پذیری قوی برای پروتئین

های کراتین همچون سیتوکراتین به نفع مزوتلیوما می باشد(۷). وقتی که مزوتلیومای بدخیم رد شده باشد نشانگرهای سیتوکراتین در افتراق اسکواموس سل کارسینوما از آدنوکارسینوما مفید هستند(۸). تمام تومورهای سلول سنگ فرشی برای سیتوکراتین مثبت می شوند اما ۱۰-۴۰ درصد برای آدنوکارسینوم ها مثبت می شوند. سیتو کراتین می تواند در افتراق مایع پلوری بدخیم از خوش خیم مفید باشد به ویژه در آنهایی که با سرطان سلول های غیر ریوی همراه هستند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ایمنو سیتوشیمی این نشانگرها در سلول های بدخیم در مایعات سروزی بود تا به تایید مایعات بدخیم یا مشکوک به بدخیمی کمک نماید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی جامعه پژوهش ۴۰ مایع سروزی (شامل مایع پلور و آسیت) ارسالی به بخش پاتولوژی بیمارستان ۵ آذر گرگان بود. لام های سیتولوژی پس از سانتریفوژ با دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و ثابت شدن با اتانول ۹۵ درصد تهیه گردید. از ۶ عدد لام تهیه شده از هر نمونه دو لام توسط رنگ آمیزی پاپانیکولائو رنگ شده و در صورت مثبت یا مشکوک بودن به بدخیمی دیگر لام ها برای سه آنتی بادی مورد نظر به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ آمیزی و توسط دو پاتولو ژیست مستقل لام ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی از کیت های منوکلونال(clone E29) EMA و (clone 11-7) CEA و سیتوکراتین(clone AE1/3) شرکت داکو استفاده گردید. نتایج به دست آمده در رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی که به صورت مثبت یا منفی گزارش شده و با روش سیتولوژی مرسوم (که توسط پاپانیکولائو رنگ آمیزی شده اند)مقایسه شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری کای دو مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

روی ۴۰ مورد مایع سروزی (۱۵ مورد بدخیم و۲۵ مورد مشکوک به بدخیمی) به کمک سه نشانگر مورد نظر رنگ آمیزی به روش ایمنوسیتو شیمی انجام گردید. از ۴۰ مورد بدخیم یا مشکوک به بدخیمی ۱۹ نمونه (۴۷/۵٪) از مردان و ۲۱ نمونه(۵۲/۵٪) زنان بود. بیشترین گروه های سنی مبتلا به بدخیمی نیز در سنین بین ۴۰-۸۰ سال (۸۰٪موارد) قرارداشتند(جدول۱) از۱۵ نمونه بدخیم به جز ۲ مورد با هر سه نشانگر مثبت شدند و ۲ مورد تنها با نشانگر CEA منفی شده بودند که در نمونه بیوپسی بعدی از نوع سلول سنگ فرشی تشخیص داده شدند. در ۲۵ مورد مشکوک به بدخیمی ۱۵ مورد به صورت قوی و ۶ مورد به صورت ضعیف با نشانگر EMA مثبت بودند و ۴ مورد نیز منفی شدند. همچنین از ۲۵ مورد مشکوک به بدخیمی ۱۵ مورد به صورت قوی و ۵ مورد به صورت ضعیف با نشانگر CK مثبت شد و۵ مورد نیز منفی نشان داد. همچنین از این ۲۵ مورد مشکوک ۵ مورد به صورت قوی و۵ مورد به صورت ضعیف با نشانگر CEA مثبت بوده و ۱۵ مورد نیز منفی گزارش شد. در بررسی سیتولوژیک نیز در ۱۰ مورد بدخیمی با احتمال بیشتر آدنوکارسینوما مطرح گردیده است که همگی با نشانگر CEA مثبت شدند(جدول۲).

جدول ۱- جدول توزیع سنی بیماران با مایعات سروزی بدخیم

سن	زن	مرد	جمع	درصد
۲۱-۴۰	۲	٤	٦	٪۱۵
٤۱-٦۰	۸	۸	۱٦	٪٤۰
٦۱-۸۰	۹	۷	۱٦	٪٤۰
>۸۱	۲	-	۲	٪۵
جمع کل	۲۱	۱۹	٤۰	٪۱۰۰

جدول۲-جدول فراوانی موارد مثبت سه مارکر موردبررسی

تومورمارکر / نوع سلول	CEA	EMA	CK	مجموع
بدخیم	۱۳	۱۵	۱۵	۱۵
مشکوک به بدخیمی	۱۰	۲۱	۲۰	۲۵
مجموع	٪۵۷/۵)۲۳	٪۹۰)۳٦	٪۸۷/۵)۳۵	٤۰

بحث

در این مطالعه ۹۰ درصد مایعات سروزی بدخیم برای EMA واکنش نشان دادند و ۸۷/۵ درصد برای CK مثبت بودند اما ۱۵ مورد یعنی۴۲/۵ درصد برایCEA منفی بوده است. گرچه فقدان رنگ پذیری برایCEA و رنگ پذیری برای CK به نفع مزوتلیوماست(۷). درنمونه های این مطالعه منفی بودنCEAهمراه با مثبت بودنEMA و CK به صورت قطعی نشان دهنده مزوتلیوما نیست بلکه می تواند به علت نوع غیر آدنوکارسینومی تومور متاستاتیک باشد. رنگ آمیزی غشاء سلول های تومری ممکن است بسیار مشابه با سلول های التهابی همراه باشد و لذا افتراق این دو نوع سلول از هم دشوار می باشد. همچنین بین پاتولوژیست ها تفسیر ایمنوراکتیویتی این دو دسته سلول نیز می تواند متفاوت باشد و مشکل تشخیصی به وجودآورد(۱۲). چون مزوتلیوم بدخیم و اکثر آدنوکارسینوم های متاستاتیکایمنوراکتیویتی شدیدی با سایتوکراتین ها نشان می دهند، به نظر می رسد افزودن این نشانگر به یک پانل برای تشخیص افتراقی این دو از یکدیگر اعتبار چندانی برای افتراق آنها ندارد (۱۳). مطالعاتی که بر روی مایعات سروزی انجام شده است ، نشان داده که میزان مثبت بودن EMA برای مزوتلیوم بدخیم ۷۵ درصد و برای آدنوکارسینوم ۹۱ درصد و برای موارد راکتیو تنها ۶ درصد بوده است(۱۵). EMA به دلیل اشکال در تفسیر الگوهای رنگ پذیری، معمولاً نشانگر مناسبی برای تشخیص افتراقی آدنوکارسینوم از مزوتلیوم بدخیم نیست(۱۵). اما مشخص شده که EMA نشانگر اپیتلیالی قابل اعتماد و مفیدی در افتراق سلول های کارسینومی از سلول های مزوتلیالی واکنشی است(۱۶). در یک بررسی، میزان مثبت بودن CEA برای مایعات سروزی ناشی از آدنوکارسینوم بین ۲۱-۷۹ درصد متفاوت بوده است که کمتر از میزان آن در بررسی های انجام گرفته بر روی نمونه های بافتی بوده است. این دامنه وسیع واکنش ایمنی احتمالاً مربوط به نوع آنتی بادی های مورد استفاده در مطالعه بوده است(۱۷).

نتیجه گیری

از آنجا که بیشترین موارد واکنش مثبت در رنگ آمیزی ایمنو سیتو شیمی برای مایعات سروزی بدخیم یا مشکوک به بدخیمی بین سه نشانگر فوق را نشانگر EMA به خود اختصاص می دهد (۹۰٪ موارد در این مطالعه در مقایسه با ۹۸ درصد موارد در دیگر مطالعات) در موارد شک به وجود سلول کارسینومی در مایعات سروزی، برای تایید تشخیص کارسینوما، استفاده از این نشانگر و در درجه بعدی نشانگر سیتوکراتین(CK) پیشنهاد می شود. همچنین در همه ۱۰ موردی که تشخیص قطعی یا مشکوک به آدنوکارسینوم داشتند، در مایعات سروزی از نظر نشانگر CEA نیز مثبت بودند (که این اختصاصیت ۱۰۰ درصد برای CEA را مطرح می نماید). لذا برای قطعیت تشخیص در موارد آدنوکارسینوم در مایعات سروزی، مشکوک به استفاده از این نشانگر توصیه می شود. متاسفانه از آنجا که پانل فوق تنها در موارد مثبت ومشکوک به بدخیمی انجام شده و در موارد غیر بدخیمی موردارزیابی قرار نگرفته است، تعیین موارد مثبت و منفی کاذب امکان پذیر نبود.

تشکر و قدردانی

با قدردانی از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان و کارکنان بخش پاتولوژی بیمارستان ۵ آذر گرگان که انجام این پژوهش را امکان پذیر ساختند.

References

1.Juan Rosai, Ackerman S. *Surgical pathology.* Volume 1. 9th Ed, Mosby. 2011; 347.

2. Chernow B,Sahn SA. *Carcinomatous involvement of the pleura. An analysis of 96 patients*. Am J Med. 1977; 63(5): 695-702.

3.Koss MD, Leopold LG. *Diagnostic Cythology and Its Histopathologic Bases*. Volume 2, 4th Edition. Lippincott Co. Philadelphia. 1992; 1548-1549.

4.Stoop JA, Hendriks JG, Berends D. *Identification of malignant cells in serous effusions using a panel of monoclonal antibodies Ber-Ep4,MCA-b-12 and EMA.* Cytopathology. 1992; 3(5): 297-302.

5.Ueda J, Iwata T, Ono M, Takahashi M. *Comparision of three cytologic preparation methods and immunocytochemistries to distinguish adenocarcinoma cells from reactive mesothelial cells in serous effusion*. Diagnostic Cytopathology. 2006; 34(1): 6-10.

6. Steven G, Silverberg MD. *Principles & practice of surgical pathology and Cytopathology*. 4th ed. Churchill Livingstone. 2006; 166.

7. Kumar V, Fausto N, Abbas A. *Robbins and Cotran Pathologic basis of diseases.* Volume2. 7th ed. Elsevier Sanders. 2005; 768-769.

8.Pu Rt, Pang Y, Michael CW. *Utility of WT-1,P63,MOC31,and mesoytelin,and cytokeratin immunostains in differentiating adenocarcinoma,squamous cell carcinoma and malignant mesothelioma in effusions*. diagnostic cytopathol. 2008; 36(1): 20-5.

9.Lai RS, Chen CC, Lee PC, Lu JY. *Evaluation of cytokeratin 19 fragment as a tumor marker in malignant pleural effusion*. Jpn J Clin Oncol. 1999; 29(9): 421-4.

10.Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. *Use of a panel of tumor markers (CEA,CA 125,CA 15-3 and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions.* Chest. 2004; 126(6): 1757-63.

11. Cakir E, Demirag F, Aydin M, Unsal E. *Cytopathologic Differential Diagnosis of malignant mesothelioma, adenocarcinoma,and reactive mesothelial cells:A logistic regression analysis*. Diagn Cytopathol. 2009; 37(1): 4-10.

12. Ordonez NG. *The immunhistochemical diagnosis of epithelial mesothelioma*. Hum pathol. 1999; 30(3): 313-23.

13. Ordonez NG. *The immunhistochemical diagnosis of epithelial mesothelioma. Differentiation of mesotelioma and lung adenocarcinoma*. Am J Surg Pathol 1989; 13(4): 276-91.

14. Sheild PW, Callan JJ, Devine PL. *Markers for metastatic adenocarcinoma in serous effusion specimens.* Diagn cytopathol. 1994; 11(3): 237-45.

15. Ordonez NG. Role of immunohistochemistry in diffrentiaing epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. Am J Clin Pathol. 1999; 112(1): 75-89.

16.Ray K, Mittal S, Gupa H, Jain M. *Cytological study of serous effusions with the aid of tumour markers*. J Indian Med Assoc.1999; 97(1): 11-19.

17. Miedouge M, Rouzaud P, salama G, Pujazon M-C, Vincent C, MauduytM-A, et al. *Evaluation of seven tumor markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusion*. Br J Cancer. 1999; 81(6): 1059-65.

Winter 2014, Vol 7, No 4

Original Article

The Identification of Malignant Cells in Serous Fluids Using a Panel of Monoclonal Cytokeratin Antibodies, Epithelial Membrane Antigen(EMA), Carcino Embryonic Antigen (CEA)

Kazeminejad, V. (MD)
Assistant professor of Pathology, Department of Pathology, School of Medicine,Golestan

Azarhoosh, R. (MD)
Associated Professor of Pathology, Department of Pathology, School of Medicine, Golestan

Corresponding Author:
Kazeminejad, V.

Email:
vahidehkazeminejad@yahoo.com

Received: 29 Oct 2012
Revised: 12 Feb 2013
Accepted: 16 Feb 2013

Abstract

Background and Objective: Identification of malignant cells and the type of malignancy in Effusionsis very important. The main aim of this study was to differentiate between reactive mesothelial cells and malignant cells, and to determine the type of the tumor cells in effusions with the aid of tumor markers Creatine Kinase (CK), EMA and CEA.

Material and Methods: Forty serous fluid cytology samples delivered to pathology laboratory of Panje- Azar Hospital (15 were malignant and 25 were suspected for malignancy) were stained by immunocytochemistry technique with the aid of aforementioned tumor markers, CK, EMA and CEA.

Results: Of 15 malignancy cases, 13 were positive for three markers and the rest were negative just for CEA. In 25 of suspected to malignancy for EMA: 15 were strongly and 6 weakly positive and 4 were negative; for CK: 10 were strongly and 5 weakly positive and 5 cases were negative; and for CEA: 5 were strongly and 5 weakly positive and 15 were negative.

Conclusion: Totally, % 87.5 of malignant fluid were positive for CK marker and %90 for EMA marker. EMA and CK were found to be the most reliable epithelial markers and very useful in differentiating carcinoma cells from reactive mesithelial cells. In Ten (40%) of the samples suspected to adenocarcinoma, CEA was positive and this indicate that CEA can be an important reference for identifying malignant effusions.

Keywords: Monoclonal Antibody; Cytokeratin; Epithelial Memberane Antigen; Carcinoemberyonic Antigen

This paper should be cited as: Kazeminejad V, Azarhoosh R. [The Identification of Malignant Cells in Serous Fluids Using a Panel of Monoclonal Cytokeratin Antibodies, Epithelial Membrane Antigen(EMA), Carcino Embryonic Antigen (CEA)]. MLJ. 2014; 7(4): 41-46.[Article in Persian]