بررسی ایمونوهیستوشیمی یک مورد سرطان سلول‌های سنگفرشی واژن گاو

سعید حصارکی[۱*]، علیرضا عزیزی‌سراجی[۲]

چکیده

یک گاو ماده ٦ ساله نژاد هولشتاین به وزن ٤٥٧ کیلوگرم به دلیل وجود یک زائده خونریزی دهنده و زخمی ۸×۵×۷/۵ سانتی متری در ناحیه واژن ارجاع گردید. زائده مورد نظر با عمل جراحی برداشته و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال شد. گزارش هیستوپاتولوژیک نمونه دال بر کارسینومای سلول خاردار بود. جزایر سلول‌های خاردار بصورت دوار و اغلب بدون ماده شاخی **(Squamous eddies)** در عمق بافت همبندی نفوذ کرده بودند.در بررسی ایمنوهیستوشیمی مثبت بودن مارکرهای **AE1/AE3** و **CK5/6** دال بر خاستگاه کراتینوسایتی تومور بود. ولی مثبت شدن **Ck8** و **PCNA**(به میزان۵۰درصد)به درجه بالای بدخیمی استناد می‌کرد. بنابراین تومور باتفکیک و تمایز اندک مهاجم تشخیص داده شد.این نشان می‌دهدکه استفاده ازمارکرهای ایمنوهیستوشیمی تا چه اندازه در بیان پیش آگهی و نوع برخورد درمانی با آن تاثیر گذاراست.

واژگان کلیدی: *SCC، واژن، گاو، ایمونوهیستوشیمی*

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۲٦

مقدمه

کارسینومای سلول خاردار (Squamous Cell Carcinoma: SCC) در گاوها بیشتر در محل مخاطات بخصوص ملتحمه و پلک بروز می‌نماید(۱). کارسینومای وستیبول و واژن در گاوها شیوع زیادی دارد و ظاهری زخمی یا تکثیر شونده با حالت پایه‌دار دارد. این تومور اغلب مهاجم بوده ولی میزان متاستاز آن اندک می‌باشد(۹). تومورهای پوست طیف وسیعی از تظاهرات و نماهای میکروسکوپی را در برش‌های H&E(Hematoxilin and Eosin) نشان می‌دهند. ساختار سلولی، طرح رشد و تمایز بعلاوه رفتار بالینی معیارهایی برای تقسیم‌بندی تومورهای پوستی هستند. آنالیز ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) و فراساختاری، جهت تایید این تقسیم‌بندی‌ها و بر اساس استفاده از آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌ژن‌های ساختمانی و آنزیمی سلولی استفاده می‌شود. تومورهای اپیدرم پوست درآزمایش مارکرهای کراتین با وزن مولکولی بالا (High Molecular Weight: HMW) از قبیل CK5 (Cytokeratin5) مثبت است، ولی گاهی با مارکرهای کراتین سبک وزن (Low Molecular Weight: LMW) از قبیلCK8 (Cytokeratin8) بویژه اگر مهاجمتر باشند نیز مثبت می‌شوند(۲). امروزه در بسیاری از تومورهای انسان و حیوانات از انواع مارکرهای ایمونوهیستوشیمی در تشخیص و تعیین درجه بدخیمی آنها استفاده می‌شود.

گزارش درمانگاهی

یک گاوه ماده ٦ ساله نژاد هولشتاین به وزن ٤٥٧ کیلوگرم بعلت وجود توده‌ای زخمی، برجسته و خونریزی دهنده به ابعاد ۸×۵×۷/۵ سانتی‌متر روی سطح واژن، تحت عمل جراحی قرار گرفت و توده مذکور پس از خروج، به آزمایشگاه آسیب‌شناسی ارسال گردید. در ظاهر توده سفت و سفید رنگ بود. پس از برداشت نمونه توموری، از طریق جراحی و برش عرضی آن، در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد و بر اساس روش‌های رایج ،مقاطع مورد نیاز تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. در روش ایمونوهیستوشیمی آنتی‌بادی‌های AE1/AE3 (clone AE1/AE3)، CK8 (clone 35β H11)، CK5/6 (clone D5/16 B4)، PCNA (clone pc10 N1529) و P53 (clone DO-7) از کیت Dako جهت رنگ‌آمیزی

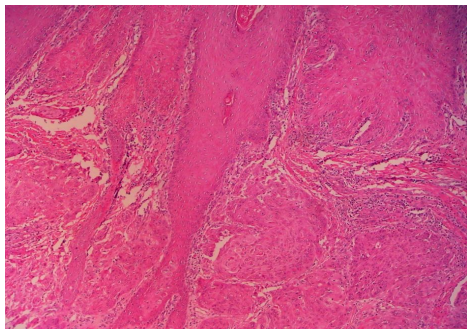
۱*- گروه آسیب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
Email:hesarakisaeed@yahoo.com
۲- دانشجوی دوره کارشناسی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی (عضو باشگاه پژوهشگران جوان) واحد علوم و تحقیقات تهران،ایران.

نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در نمای میکروسکوپی، متن تومور متشکل از جزایر حاوی کراتینوسایت‌های (keratinocytes) فعال و گاهی با شکل عجیب (bizarre shape) بود که بصورت دوار بدون کراتین مرکز جزیره‌ای (Squamous eddies) دیده شد. همچنین سلول‌های تومور مروارید شاخی (horny pearl) را نیز به میزان بسیار کمتر تشکیل داده بودند (نگاره ۱). تهاجم سلول‌های توموری بصورت ترابکول‌های طویل و فرار سلول‌ها، بصورت تکی یا چند عددی به عمق بافت درم بود. گستره همبندی، کانون‌های توموری را از یکدیگر مجزی ساخته بود(نگاره ۱). در بررسی ایمونوهیستوشیمی مارکرهای Ck8، PCNA، AE1/AE3، و CK5/6 در این تومور مثبت ارزیابی شد(نگاره های ۳،۲).

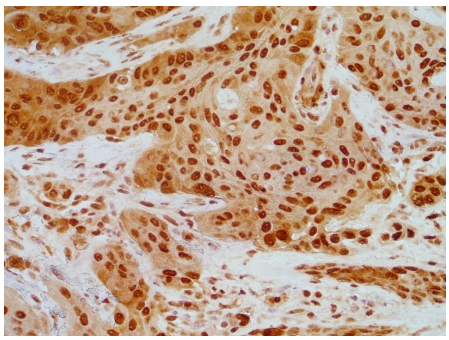
بحث

تشخیص رایج تومورهای پوستی بر اساس ارزیابی هیستوپاتولوژی و رنگ‌آمیزی عادی بافتی صورت می‌پذیرد. در صورت نیاز جهت تشخیص افتراقی و پیش آگهی از مارکرهای ایمونوهیستوشیمیایی استفاده می‌گردد. Stenbäck و همکاران در سال ۱۹۹۸ با انجام رنگ‌آمیزی علیه PCNA (Proliferation Cell Neuclear Antigen) و P53 در نمونه‌های پوستی اخذ شده از موش‌های در معرض اشعه UV و ۷-۱۲ دی متیل بنزآنتراسن 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) مشاهده کردند که محل قرارگیری و تعداد سلول‌های P53 مثبت ارتباط نزدیکی با نوع تومور و درجه بدخیمی آن دارد، ولی مارکر PCNA چنین ارزشی در تعیین میزان بدخیمی ندارد(۱۱). البته مارکر PCNA در تفکیک کراتوآکانتوما (Keratoacanthoma) از SCC بسیار با ارزش است. زیرا این مارکر در کراتوآکانتوما فقط لبه‌های تومور را رنگ می‌کند درحالیکه در SCC سراسر تومور واکنش مثبت نشان می‌دهد(۱۰). واکنش با مارکر PCNA دال بر بدخیمی بیشتر است (٦و۹). تومور مورد بررسی ما از لحاظ مارکر PCNA بصورت سرتاسری مثبت و لذا تشخیص بدخیمی زیاد تقویت شد. تومورهای بافت سنگفرشی مطبق با مارکرهای کراتین AE1/AE3 و CK5/6 واکنش مثبت نشان می‌دهند(۲و۵). Farrar و همکاران در سال ۲۰۰٤ با بررسی ایمونوهیستوشیمی تومورهای پوششی محوطه دهانی انسان دریافتند که کاهش بروز مارکرهای AE1/AE3 و CK14 بهمراه افزایش بروز P53 و Ki-67 در SCC از لحاظ آماری بطور معنی‌داری دال بر بدخیمی بیشتر این تومورها می‌باشد(۵). تومور مورد نظر ما بشدت با مارکرهای کراتین AE1/AE3 و CK5/6 واکنش مثبت نشان داد، با ارزیابی مطالعات گذشته گمان می‌رود که مارکر P53 از مهمترین مارکرهای تعیین درجه بدخیمی تومورهای بافت سنگفرشی مطبق باشد(۳). Batinac و همکاران در سال ۲۰۰٤ ضمن مطالعه ایمونوهیستوشیمی مارکرهای P53 و Ki67 روی ۱۵۰ مورد تومور اپیدرمی و نیز ضایعات غیر توموری پوستی بیان داشتند که واکنش به P53 در پوست سالم، آماسی، کراتوآکانتوما و SCC دیده میشود، ولی اختلاف این بروز بطوری واضح است که از این مارکر می‌توان جهت تفکیک تومور بدخیم از خوش خیم و سایر ضایعات پوستی کمک گرفت(۳). Carvalho و همکاران در سال ۲۰۰۵ با انجام رنگ‌آمیزی با مارکر P53 در مورد ۱۵ تومور SCC چشمی گاوها ۱۰ مورد واکنش مثبت با مارکر P53 مشاهده کردند (٤). در SCC خوب تمایز یافته فقط در حاشیه تومورP53 مثبت می‌شود در حالیکه موارد SCC کم تمایز یافته P53 در سراسر تومور مثبت خواهد شد(۱۱). نمونه مورد مطالعه فقط در سلول‌های لایه بازال توموری P53 مثبت بود، که خود دلیل متوسط بودن درجه بدخیمی آن است. Lavrijsen و همکاران در سال ۱۹۹۹ با انجام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی علیه چندین سایتوکراتین در SCC پوست انسان به این نتیجه رسیده بودند که موارد مثبت با مارکر CK8 دارای جزایر سلولی اندک و سلول‌های بازال فراوانی می‌باشد. در واقع هرچه بروز CK8 بیشتر باشد، ماده شاخی کمتر و(Squamous eddies) بیشتر

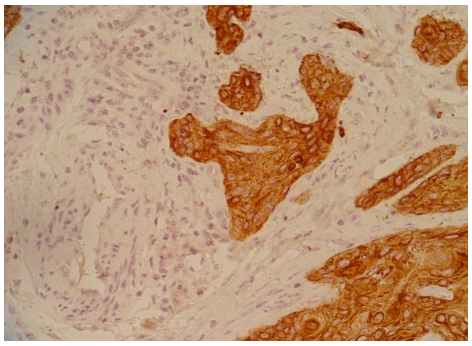
خواهد بود و در نتیجه تومور بدخیمی بیشتری نشان می‌دهد(۸). Gires و همکاران در سال ۲۰۰۶ با انجام رنگ آنتی بادی ایمونوهیستوشیمی علیه CK8 ، pan CK و Ki67 در مورد تومورهای پوششی ناحیه سر و گردن انسان به این نتیجه رسیدند که با وجودیکه مارکرهای مذکور در انواع تومورهای سر وگردن رنگ‌پذیری دارند و Ki67 یک مارکر نشانگر تقسیم سلولی است ولی CK8مارکر تفکیک بدخیمی از سایر ضایعات ناشی از سازش بافت پوششی نظیر لکوپلاکی محوطه دهانی است. نامبردگان بیان داشتند که CK8 با وجودی‌که در اپیتلیوم طبیعی و هایپر پلاستیک رنگ‌پذیری ندارد ولی بشدت در موارد دیسپلازی و تومور بدخیم سلول‌های پوششی پوست (Scc) و متاستازهای آن رنگ داخل سیتوپلاسمی ایجاد می‌کند(۷). تومور مورد نظر ما، CK8 مثبت بود، و تهاجم و نفوذ آن به بافت‌های زیرین بسیار مشهود بود که با یافته های Lavrijsen و Gires همخوانی دارد.



نگاره ۱ـ نمای میکروسکوپیک، آشیانه‌های سلول‌های توموری که در وسط تشکیل مروارید شاخی داده اند در عمق بافت درم قابل مشاهده است. بافت همبندی بین آشیانه‌ها حضور دارد(H&E × ٤٥٠).



نگاره ۲ـ نمای میکروسکوپیک مقطع رنگ شده بوسیله آنتی‌بادی علیه PCNA، سلول‌های توموری از نوع سنگفرشی در مقابل PCNA بشدت واکنش رنگی داخل هسته‌ای نشان می‌دهند(anti- PCNA× ٧٥٠).



نگاره ۳ـ نمای میکروسکوپیک مقطع رنگ شده بوسیله آنتی‌بادی علیه AE1/AE3، سلول‌های توموری از نوع سنگفرشی در مقابل AE1/AE3 بشدت واکنش رنگی داخل سیتوپلاسمی نشان می‌دهند (anti -× ٦٥٠) AE1/AE3.

فهرست منابع

۱- سهرابی حقدوست، ا،(۱۳۷۰) سرطانزایی و سرطان‌شناسی دامپزشکی، تهران، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران: ۱۳۵-۱۳۷.

۲- عموئیان، س،طیبی میبدی، ن، عطاران زاده، آ،(۱۳۸۲) ایمونوهیستوشیمی تشخیصی، مشهد، واژیران: ۱۷۹-۱۷۸.

3- Batinac, T. Zamolo, G. Jonjic, N. Gruber, F and Petrovec, M. (2004): p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. Tumori, 90: 120-127.

4- Carvalho, T. Vala, H. Pinto, C. Pinho, M and Peleteiro, M. C. (2005): Immunohistochemical Studies of Epithelial Cell Proliferation and p53 Mutation in Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. Veterinary Pathology 42:66-73.

5- Farrar, M. Sandison, A. Peston, D. Gailani, M. (2004): Immunocytochemical analysis of AE1/AE3, CK 14, Ki-67 and p53 expression in benign, premalignant and malignant oral tissue to establish putative markers for progression of oral carcinoma. Br J Biomed Sci.; 61(3):117-24.

6- Franchi, A. Moroni, M. Massi, D. Paglierani, M and Santucci, M. (2002): Sinonasal undifferentiated carcinoma, nasopharyngeal-type undifferentiated carcinoma, and keratinizing and nonkeratinizing squamous cell carcinoma express different cytokeratin patterns. Am J Surg Pathol. 2002 Dec; 26(12):1597-604.

7- Gires, O. Mack, B. Rauch, J and Matthias, C. (2006): CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 343, Issue 1,: 252-259.
8- Lavrijsen, A. P. M. Tieben, L. M. Ponec, M. Van der Schroeff, J. G and Muijen, G. N. P. (1999): Expression of EGF receptor, involucrin, and cytokeratins in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of the skin. Archives of Dermatological Research. (28): 83-88.
9- Meuten, D. J. (2002): Tumors in domestic animals. 4thEd. Blackwell publishing company. USA.:560-561.
10- Phillips, P and Helm, F. (1993): Proliferating cell nuclear antigen distribution in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. Journal of Cutaneous Pathology Volume 20 Issue 5,:424-428.
11- Stenbäck, F. Mäkinen, M and Jussila, T. (1998): p53 expression in skin carcinogenesis and its relationship to cell proliferation and tumour growth. Eur J Cancer. 34 (9):1415-24.