مقایسه روش رنگ آمیزی H&E با روش IHC در شمارش لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال نمونه های بیوپسی دئودنوم

افسانه رجبیانی[1]، اصغر عالیه پور[2]، دکتر سید محمد توانگر[3]، دکتر علی پاشا میثمی[4]

1- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
2- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
3- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
4- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

یافته / دوره نهم / شماره 4 / زمستان 86 / مسلسل 34

چکیده

دریافت مقاله: 86/8/24، ***پذیرش مقاله***: 86/10/3

Ø مقدمه : از بیوپسی های دئودنوم بعنوان ابزاری برای غربالگری افراد مشکوک به بیماری سلیاک استفاده میشود. برای تشخیص این بیماری ، افزایش تعداد لنفوسیتهای اینتراپیتلیال (IELs) حتی در مواردیکه ساختمان پرزهای روده ای طبیعی است مهم بوده و می تواند دلیلی بر عدم تحمل به گلوتن باشد. هدف از این مطالعه مقایسه دو روش مختلف رنگ آمیزی بافتی H&Eو IHC برای اندازه گیری لنفوسیتهای اینتراپیتلیال در بیوپسی های دئودنوم است

Ø مواد و روش‌ها: این مطالعه بصورت مقایسه ای و بر روی 74 نمونه بیوپسی دئودنوم از فروردین تا شهریور ماه سال 1383 در بیمارستان دکتر شریعتی تهران انجام پذیرفت. در این پژوهش همه لنفوسیتهای اینتراپی تلیال به روش یکسوکور مورد بررسی قرار گرفتند..

Ø یافته‌ها: میانگین تعداد لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال به ازای یکصد سلول اپیتلیال در مشاهده اول و دوم به ترتیب 15/77 و 16/72 برای نمونه های رنگ شده به روش H&E و 21/54 و 21/18 برای موارد رنگ شده به شیوه IHC محاسبه گردید. مقایسه میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در لامهای رنگ شده به روش H&E و LCA نشان داد که LCAدر نشان دادن لنفوسیتها حدودا" پنج سلول بر H&E برتری دارد.

Ø بحث و نتیجه گیری: برای آنالیز لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال دو مرحله محاسبه لنفوسیتها با استفاده از رنگ آمیزی H&E ، رنگ آمیزی LCA و شمارش لنفوستها با این روش در مواردیکه پژوهشگر موارد مشکوک مواجه می شود (موارد با لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال نرمال اما نزدیک به نقطه cut – off point) پیشنهاد می گردد. چنانچه در مواردی به هر دلیل رنگ آمیزی IHC انجام نشود میتوان از فرمول زیر استفاده کرد: IELs on IHC ≅ IELs on H&E + 5 .

.Ø کلید واژه‌ها: لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال، IHC و H&E

آدرس مکاتبه: تهران، خیابان کارگر شمالی، بزرگراه جلال آل احمد، بیمارستان دکتر شریعتی، گروه پاتولوژی
پست الکترونیک: Aaliehpour @razi.tums.ac.ir

مقدمه

افزایش در تعداد لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال[1] کلید تشخیصی بیماری سلیاک در نمونه هایی است که هنوز دچار آتروفی[2] پرزهای روده ای نشده اند (1). مطالعات اخیر نشان داده اند که فقط 30% از بیماران حساس به گلوتن دارای مخاط پهن هستند (2). از طرفی در مواردیکه بیماری سلیاک به فرم کلاسیک خود بروز نکرده باشد مانند موارد غیر نمادین[3] و خاموش[4] ،افزایش لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال یکی از پایه های اصلی تشخیص است (3).

بر همین اساس مارش پیشنهاد یک دسته بندی[5] برای ظاهر ریخت شناسی بیوپسی های دئودنوم در بیماران دچار سلیاک را داد که در درجات صفر و یک آن هنوز تغییری در پرزرها یا کریپتهای[6] مخاطی دیده نمی شود (2و4). به هر حال هنوز هم بزرگترین نارسایی ها[7] در تشخیص سلیاک در رابطه با یافته های هیستولوژیک رخ می دهند که این خود بیشتر ناشی از مواردی همچون تهیه نمونه به روش نامناسب و برشهای مماسی از بافت می باشد که تفسیر نمونه را دچار اشکال می کنند (4، 5). در چنین شرایطی است که انجام مطالعه ایمنوهیستوشیمی[8] بدلیل رنگ آمیزی کردن مناسب سیتوپلاسم لنفوسیتها افتراق آنها را از انتروسیت ها[9] آسان می سازد و می تواند در تعیین مارش راهگشا باشد. (6)

اهمیت و فواید تشخیص بیماری سلیاک در این مرحله شامل درمان بیمار، جلوگیری از سوء تغذیه (و عوارض ناشی از آن) و کاهش خطر بیماریهای بد خیم می باشد که مورد اخیر خود مشتمل بر لنفوم بد خیم ، کارسینوم روده کوچک و کارسینوم سلول سنگفرشی مری می باشد. (7و2و1)

این مطالعه بدنبال یافتن جایگاه مطالعه ایمنوهیستوشیمی در ارزیابی نمونه های بیوپسی دئودنوم بیماران مشکوک به سلیاک بعنوان استاندارد طلایی[10] می باشد.

در این مطالعه همچنین الگوی توزیع لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال در پرزهای روده بعنوان یک شاخص تشخیصی برای انتروپاتی حساس به گلوتن مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، روش مرسوم رنگ آمیزی H&E[11] با روش استاندارد IHC برای شمارش لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال مشاهده شده در بیوپسی های دئودنوم مقایسه گردیده است.

جمعیت مورد مطالعه افرادی بوده اند که از نظربالینی به بیماری سلیاک مشکوک بوده و بیوپسی از قسمت دوم دئودنوم آنها بعمل آمده است.

همه نمونه های انتخاب شده برای ارزیابی هیستولوژیک از کفایت[12] موردنظر (یافتن حداقل چهار پرز در یک ردیف) برخوردار بوده اند و همچنین فاقد تغییرات پیشرفته بیماری سلیاک بوده اند زیرا از مارش I به بالا ، افزایش لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال تنها یافته مرفولوژیک تشخیصی برای بیماری سلیاک نمیباشد. نمونه گیری در این مطالعه به روش غیر احتمالی آسان[13] می باشد.

با در نظر گرفتن اطلاعات حاصل از مطالعات مشابه، حجم نمونه معادل 69 مورد محاسبه گردید (با حدود اطمینان معادل 95%). اما در عمل 74 نمونه تحت دو آزمون H&E و IHC قرار گرفتند. مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی تهران ، بیمارستان دکتر علی شریعتی و در نیمه اول سال 1383 انجام پذیرفت.

ابتدا لامهایی که به روش H&E رنگ آمیزی شده بودند هر کدام دو بار و در زمانهای مختلف بصورت یکسو کور توسط پاتولوژیست دارای مهارت در این زمینه مورد بررسی قرار گرفتند و اطلاعات حاصل از شمارش در یک جدول توخالی[14]

1. Intra epithelial lymphocytes
2. Atrophy
3. Atypical
4. Silent
5. Classification
6. Crypts
7. Pitfalls
8. Immunohistochemistry
9. Entrocytes
10. Gold standard
11. Hematoxylin-eosin
12. Adequacy
13. Simple non – probably
14. Dummy table

ذخیره گردید. سپس از بلوکهای مربوط به بیماران برش مجدد بعمل آمده و این بار رنگ آمیزی به روش IHC صورت پذیرفت. بررسی بافتهای اخیر نیز به همان شیوه قبلی انجام گرفته و اطلاعات حاصله ثبت گردید. درهربارشمارش لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال تعداد 5-3 ویلوس بصورت اتفاقی[1] مورد بررسی قرارگرفتند و تعداد لنفوسیتها به ازای 500-300 سلول اپی تلیال شمارش گردیدند.

علاوه بر این در نمونه هایی که افزایش تعدادلنفوسیتهای اینترا اپیتلیال رانشان می دادند، نسبت لنفوسیتها در انتهای پرز به قاعده آن[2] نیز محاسبه و ثبت گردید. آنالیز آماری اطلاعات توسط نرم افزار SPSS ورژن11/5 انجام پذیرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش از 74 بیمار مورد مطالعه، 31 نفر (41/9درصد) زن و43 نفر (58/1 درصد) مرد بودند. میانگین سنی بیماران 40/51 سال (18/52=انحراف معیار) محاسبه گردید.

میانگین و میانه تعدادلنفوسیتهای اینتراایی تلیال در هردو بار بررسی لامهای H&E و IHC بطور جداگانه محاسبه شده است (جدول 1).

مقایسه میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال شمارش شده در دو روش رنگ آمیزی از نظر آماری انجام شد و همبستگی خطی تغییرات با تعیین ضریب همبستگی پیرسون[3] مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج بطور واضح همبستگی خطی تغییرات H&EوIHC را نشان میدهند (جدول 2).

تفاوت میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در بیوپسی های دئودنوم با دو روش رنگ آمیزی H&E و IHC نیز در این پژوهش محاسبه گردید یافته مهم این بررسی وجود اختلافی در حدود 5 سلول بین میانگین آنها بود (جدول 3).

در این مطالعه مشخص شد که بهترین مدل برای پیش بینی و تعیین فرمول برای اصلاح عدد لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال درH&E مدل خطی باشد (همبستگی خطی).

جدول شماره 1- شاخص های توصیفی لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال بر اساس روشهای H&EوIHC و در هر بار تکرار شمارش آنها برای نمونه های بیوپسی دئودنوم در نیمه اول سال 1383 در بیمارستان دکتر شریعتی تهران

	میانگین	میانه	انحراف معیار	ضریب همبستگی (CV)
شمارش اول H&E	15/77	15	7/383	%46/8
شمارش دوم H&E	16/72	15	7/840	%46/9
شمارش اول IHC	21/54	20	8/495	%39/4
شمارش دوم IHC	21/18	20	8/390	%39/6

جدول شماره 2- میزان همبستگی خطی مشاهده شده بین تعداد لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال شمارش شده در روشهای مختلف H&Eو IHC و تکرار شمارش در هر یک از روشها در مطالعه نمونه های بیوپسی دئودنوم در نیمه اول سال 1383 در بیمارستان دکتر شریعتی تهران 1383

	ضریب همبستگی پیرسون	p
مقایسه $H\&E_2$** و $H\&E_1$*	0/932	0/000
مقایسه IHC_2و IHC_1	0/953	0/000
مقایسه IHC_1 و $H\&E_1$	0/930	0/000
مقایسه IHC_2 و $H\&E_2$	0/968	0/000
مقایسه IHC_2 و $H\&E_1$	0/968	0/000
مقایسه IHC_1 و $H\&E_2$	0/941	0/000

* شمارش اول، ** شمارش دوم

1. Random
2. Tip/base ratio
3. Pearson correlation

جدول شماره 3- مقایسه میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در دو روش رنگ آمیزی H&E وIHC و تکرار شمارش آنها در نمونه های بیوپسی دئودنوم در نیمه اول سال 1383 ، بیمارستان دکتر شریعتی تهران

	شمارش شده IELs تفاوت		95% حدود اطمینان		p	CV
	میانگین	انحراف معیار	حد پایین	حد بالا		
$H\&E_1$*& IHC_1	5/7	3/1	5	6/5	0/000	%54/4
$H\&E_{2}$** & IHC_2	4/4	2/1	3/9	4/9	0/000	%47/7
$H\&E_1$ & IHC_2	5/4	2/2	4/8	5/9	0/000	%40/7
$H\&E_2$ & IHC_1	4/8	2/8	4/1	5/9	0/000	%58/3

*1= در شمارش اول **2= در شمارش دوم

آنالیز برازش[1] نیز انجام شد و بـه شـرط اطـلاع از میـزان لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در لام H&E فرمـول ذیـل بـرای پیش بینی مقدار آنها در لام IHC بدست آمد (p<0/0001).

در شمارش اول:

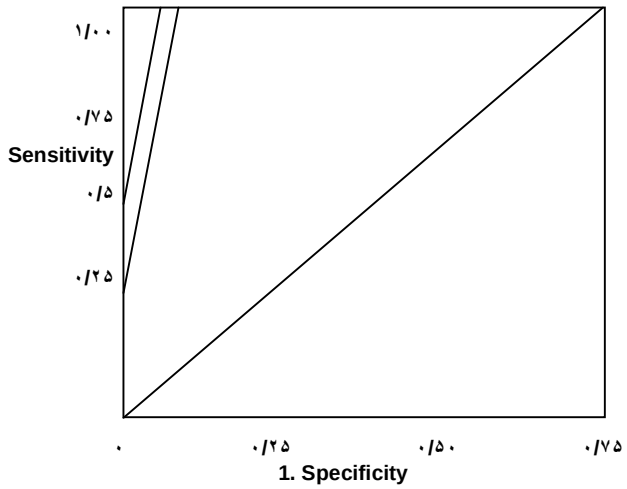
IELs on IHC= 4.7 + (1.07 x IELs on H&E)

در شمارش دوم:

IELs on IHC= 3.9 + (1.03 x IELs on H&E)

فرمول پیش گویی کننده بر اسـاس آنـالیز رگرسـیون (بـا R2=%87) بدست آمده است (p<0/0001) منحنـی راک[2] نیـز برای بررسی صحت و اعتبار آزمون ترسیم گردید (نمودار 1). در این نمودار ملاحظه می شود که سطح زیر منحنی در هـر دوبـار شمارش لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال توسط H&E به عدد یک بسیار نزدیک است (0/980، 0/988) که دلیل بر اعتبار و صحت بالای آزمون ا ست (در هر دو مورد p=0/000).

برای هر دو بار شمارش لنفوسیتهای اینترا اپـی تلیـال بـا روش رنگ آمیـزی H&E، حـساسیت و ویژگـی تعیـین شـد و بدین ترتیب بهترین نقاط برای حداکثر حـساسیت و ویژگـی در شمارش اول و دوم به ترتیـب اعـداد 23/50 و 25/50 شـناخته شدند. نسبت امر محتمل[3] نیز برای تعداد لنفوسیتهای مـشاهده شده با رنگ آمیـزی H&E در مقایـسه بـا روش IHC انـدازه گیری شد که در شمارش اول لنفوسیتهای اینترا اپی تلیـال لام H&E در سطح 22/5 سلول دارای بیشترین دقت (95%) بود و در شمارش دوم در سطح 24 سلول نیـز دارای بیـشترین دقـت ممکن (96%) بود.



نمودار شماره 1- بررسی صحت واعتبار آزمون شمارش تعداد لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال نمونه های بیوپسی دئودنوم در نیمه اول سال 1383 در بیمارستان دکتر شریعتی تهران

در این پژوهش همچنین تعیین نسبت میانگین لنفوسـیتهای اینترا اپی تلیال ناحیه انتها به قاعده پرزها در بیماران دارای افـزایش اینترا اپی تلیال لنفوسیت مد نظر قـرار گرفـت کـه ایـن نـسبت در هیچکدام از بیماران از مرز 1/7 تجاوز نکرد.

1. Regression
2. Roc curve
3. Iikelihood Ratio

بحث نتیجه‌گیری

در این پژوهش میانگین تعداد لنفوسیتهای اینتراپی تلیال درمشاهده های اول H&E ، دوم H&E، اول IHC و دوم IHC به ترتیب مقادیر 16، 17، 22 و21 بود.

مقایسه میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال شمارش شده در دو روش رنگ آمیزی H&E و IHC با تعیین ضریب همبستگی پیرسون نشان میدهد که همبستگی خطی تغییرات H&E و IHC بسیار قوی است یعنی اینکه بدنبال افزایش یا کاهش لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در لام H&E بصورت خطی میزان آنها در IHC نیز تغییر خواهد کرد و بالعکس. این بدان معنی است که با اطلاع از عددهر کدام از اینها می توان عدد دیگری را پیش بینی کرد.

بررسی تفاوت میانگین لنفوسیتهای اینتراپی تلیال در دو روش رنگ آمیزی H&E و IHC بیانگر اختلافی در حدود 5 سلول بین این دو روش می باشد به گونه ایکه همواره روش IHC تعداد لنفوسیتهای اینتراپی تلیال را در حد 5 سلول بیشتر از H&E نشان می دهد. این مطالعه نشان میدهد که بهترین مدل برای پیش بینی و تعیین فرمول برای اصلاح عدد لنفوسیتهای اینتراپی تلیال که از مطالعه H&E بدست آمده است مدل خطی[1] می باشد.

سپس می بایست بدنبال فرمولی می بودیم که به شرط اطلاع از تعداد لنفوسیتهای اینتراپی تلیال در رنگ آمیزی H&E بتوان مقدار آنها را در رنگ آمیزی IHC پیش بینی کرد لذا از آنالیز برازش برای نیل به این هدف استفاده کردیم که نتیجه آن فرمول زیر بود:

$$\text{IELs on IHC} \cong \text{IELs on H\&E} + 5$$

بر اساس آنالیز انجام شده ، این مقدار پیش گویی برای IHC به میزان 87% دقیق می باشد (p<0/0001).

برای بررسی صحت[2] و اعتبار[3] مطالعه از منحنی راک استفاده شده است. این منحنی یکی از راههای مؤثر نمایش ارتباط بین حساسیت و ویژگی در آزمونهای دارای مقادیر پیوسته است. در مطالعه حاضر سطح زیر منحنی در هر دو بار شمارش لنفوسیتهای اینتراپی تلیال توسط H&E به عددیک بسیار نزدیک بوده است که دلیلی محکم بر اعتبار و صحت بالای آزمون میباشد (p<0/0001).

در هر دو باری که شمارش لنفوسیتهای اینتراپی تلیال به روش H&E انجام شد حساسیت[4] و ویژگی[5] برای سطوح مختلف مقدار لنفوسیتها انجام شد و مشخص گردید نقاطی که برای H&E بعنوان نقطه پایانی بیشترین حساسیت و ویژگی را دارند در شمارش اول و دوم به ترتیب 23/5 و 25/5 با ویژگی بالای 99% و حساسیت 100% بودند.

سپس می بایست نسبت امر محتمل برای تعداد لنفوسیتهای مشاهده شده توسط رنگ آمیزی H&E در مقایسه با IHC در سطوح مختلف اندازه گیری گردید. پس از انجام این کار مشخص شد که در شمارش اول لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال لام H&E در سطح 22/5 سلول دارای بیشترین دقت ممکن (95%) بود. در شمارش دوم نیز در سطح 24 سلول بیشترین دقت (96%) برای H&E وجود داشت.

از آنجاییکه بر اساس مطالعات انجام شده الگوی انتشار لنفوسیتها ی اینترا اپی تلیال نیز در حالیکه هنوز آتروقی ویلوس رخ نداده است می تواند دال بر حساسیت به گلوتن باشد در این پژوهش تعیین نسبت میانگین لنفوسیتهای اینتراپی تلیال ناحیه انتها به قاعده پرزها در بیماران دارای افزایش لنفوسیتهای اینتراپی تلیال انجام شد که این نسبت در هیچکدام از بیماران از مرز مشخص شده 1/7 تجاوز نکرد.

در این مطالعه نشان داده شد که تفاوت میانگین لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال در دو روش رنگ آمیزی H&E و IHC در حدود 5 سلول می باشد لذا دو مرحله برای آنالیز لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال پیشنهاد می گردد :

1. Linear
2. Accuracy
3. Validity
4. Sensitivity
5. Specificity

در ابتدا شمارش لنفوسیتها به روش مرسوم و با استفاده لز رنگ آمیزی H&E انجام شود و موارد غیر طبیعی تشخیص داده شوند. در مرحله بعدی در صورتیکه پژوهشگر با موارد مشکوک مواجه شده است (یعنی با لنفوسیتهای اینترا اپیتلیال نرمال اما نزدیک به نقطه پایانی) رنگ آمیزی LCA برای رفع مشکل و شمارش دقیق لنفوسیتها الزامی خواهد بود.

چنانچه در مواردی به هر دلیل رنگ آمیزی IHC انجام نشود میتوان از فرمول زیر برای محاسبه لنفوسیتهای اینترا اپی تلیال استفاده کرد:

$$\text{IELs on IHC} \cong \text{IELs on H\&E} + 5$$

References

1. Rosai J, Gastrointestinal T, Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical Pathology. 9th ed. New york. MOSB Y, 2004, P: 716-717
2. Hart J. Non – neoplastic disease of the small and large Intestine. Silvernerg S G, Delellis RA, Frable WJ, Livolsi VA, wick M R. Silverberg's principles and practice of surgical pathology and cytopatholgy. 4th ed.philadelphia: ELSEVIER: 2006; PP: 1373-1376
3. Farrell R J and Kelly C P. Celiac spure and Refractory sprue. Feldman M, Friedman L S and sleisenger M H. Sleisenger & fordtrans's Gastrointestinal liver disease Pathophysiology/diagnosis/ angement.7th ed. philadephia 2002. P: 1817-1832
4. Ciclitira P J and Julia Ellis H. Celiac Disease. Yamada T, alpers D H, Kaplowitz N, Laine L, Owyang C and powell D W. Textbook of gastroenterology. 4th ed lippincott Williams & wilkin's. philadelphia 2003. P: 1580-95
5. Damjanov I.Small intestine. Damjanov I and Linder J. Anderson's Pathology. 10th ed, New York. Mosby. 1996: 1718-21
6. Kakar S. significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel samples with normal mucosal architecture. Am, J Gastroentrol 2003; 98:2027-33
7. Liu CH, Crawford JM. The Gastrointestinal tract. Kumar V, ABBAS A and Fausto N. Robbins and cotran Patholgic basis of disease.7th ed. Pahiladelphia : ELSEVIER: 2005; P: 842-844
8. Segal G H and Petras R. small intestine. Sternberg S S. Histology for pathologist. 2th ed. Lippincott-Raven. Philadephia. 1997: P: 495-508
9. Hayat M, cairns A, Dixon M F and Mahony S O.Quantitation of intraepithelial lymphocytes in Human duodenum: what is normal? Journal of clinical pathology. 2002; 55: P: 393-394
10. Veress B, Franzen L, Bodin L, Borch K.Duodenal intra- epithelial lymphocyte – count Revisited. Scand J Gastroenterol. 2004; 39(2):138-44
11. Goldstein NS. Proximal small- bowel mucosal villous intraepithelial lymphocytes. Histopathology. 2004; 44:199-205
12. Mino M. Lauwers G. Role of lymphocytic immunophenotyping in the diagnosis of Gluten- sensitive Enteropathy with preserved villous Architectue. The American Journal of Surical Pathology. 2003; 27:1237-42