

فراوانی فیبروسیت‌های CD34 مثبت در استرومای مجاور نئوپلازی اینترا اپی تلیال با درجه بدخیمی بالا و کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم سرویکس رحم

علی زارع مهرجردی: دانشیار آسیب شناسی، بیمارستان فیروزگر، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

فاطمه زجاجی کهن: متخصص آسیب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نوید محمدی: دانشیار پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، و مرکز تحقیقات طب پیشگیری و سلامت جامعه، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). nmohammadi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: تقریباً همه کارسینوم‌های مهاجم سرویکس دارای یک مرحله پیش سرطانی بوده که در آن سلول‌های غیرطبیعی محدود به اپی تلیوم هستند. این ضایعات اینتراپیتلیال، بسیاری از خصوصیات سیتولوژیک مرحله مهاجم را نشان می‌دهند. به همین دلیل افتراق نئوپلازی داخل اپیتلیومی گردن رحم (CIN III) از کارسینوم مهاجم سلول سنگفرشی (SCC) سرویکس مهم است. **روش کار:** لیست بیماران با تشخیص CINIII، SCC، مهاجم سرویکس و افراد با سرویکس نرمال از بایگانی استخراج گردید. بلوک‌های پارافینی، جدا از هر کدام یک لام تهیه شد. بلوک مناسب جهت رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی (IHC) انتخاب گردید. برش‌ها با ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و برای مارکر CD34 رنگ آمیزی شدند. نتایج توسط یک پاتولوژیست ماهر تفسیر و نمره‌دهی و نهایتاً توسط نرم افزار SPSS 17 با استفاده از روش‌های توصیفی (میانگین و انحراف معیار، نسبت و درصد) و تحلیلی (آزمون کای دو) تفسیر گردید. سطح معنی داری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. **یافته‌ها:** در بررسی نمونه بافتی سرویکس در ۶۵ نفر، ۲۰ مورد وضعیت نرمال (۳۰٪/۱۸)، ۲۰ مورد (۳۰٪/۱۸) و ۲۵ مورد (۳۸٪/۴) SCC داشتند. میانگین سنی کل، ۴۸/۹±۱۹/۳ سال بود. ۱۰۰ درصد نمونه‌های نرمال (۲۰ عدد) و CINIII (۲۰ عدد) و ۵۲ درصد از نمونه‌های SCC (۱۳ عدد) از لحاظ حضور مارکر CD34، مثبت بودند و اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/001$). **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج، این مارکر به عنوان یک تست افتراقی مناسب برای شناسایی تغییرات مربوط به کارسینومای مهاجمی در نمونه‌های سرویکس مطرح می‌شود.

کلیدواژه‌ها: نئوپلازی اینتراپیتلیال، کارسینوم مهاجم، کارسینوم سلول سنگفرشی سرویکس، مارکر CD34، رنگ آمیزی IHC

مقدمه

در سراسر جهان، سرطان گردن رحم چهارمین مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان است (۱) و دومین علت شایع ابتلا به سرطان در زنان است (۲). تقریباً ۸۰ درصد از سرطان‌های گردن رحم در کشورهای درحال توسعه رخ می‌دهد (۳). سرطان گردن رحم معمولاً علامتی ایجاد نمی‌کند، گاهی اوقات خونریزی غیرطبیعی واژینال به دنبال مقاربت جنسی یا معاینه لگنی ایجاد می‌شود و بیمار از درد حین مقاربت (تماس جنسی) شکایت دارد (۴). در زنانی که معمولاً برای غربالگری منظم مراجعه می‌کنند، اولین نشانه بیماری، تست پاپ اسمیر غیرطبیعی است. معمولاً سلول‌های غیرطبیعی (سلول‌های پیش سرطانی) در بافت‌های گردن رحمی، توسط تست پاپ اسمیر شناسایی می‌شوند.

پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) عامل خطر اولیه ابتلا به سرطان گردن رحم است. عفونت‌های HPV بسیار فراگیر و همه‌گیر هستند و از راه تماس جنسی از فردی به فرد دیگر انتقال می‌یابند. ابتلا به عفونت HIV، داشتن شریک‌های جنسی متعدد، رابطه‌ی جنسی با مردی که شریک‌های جنسی متعددی دارد، ابتلا به عفونت HPV به همراه مصرف سیگار، استفاده طولانی مدت از قرص‌های ضدبارداری همراه با ابتلا به عفونت HPV می‌توانند باعث افزایش ریسک ابتلا به این بیماری شوند (۵).

کارسینوم سلول سنگفرشی (squamous cell carcinoma, SCC) شایع‌ترین تومور گردن رحم است که بیش از ۹۰٪ از نئوپلاسم‌های اولیه سرویکس را شامل می‌شود. نئوپلازی درجا (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)

با توجه به اهمیت این موضوع و با در نظر داشتن اینکه در ایران مطالعه‌ای در این زمینه انجام نشده است بر آن شدیم تا مطالعه‌ای در رابطه با تغییر میزان بروز فیبروسیت‌های CD34+ در استرومای مجاور دیسپلازی‌های داخل اپی تلیال و استرومای کارسینوم مهاجم سلول سنگفرشی انجام دهیم.

روش کار

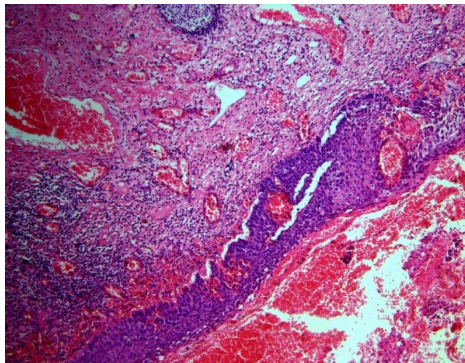
در این مطالعه مقطعی توصیفی - تحلیلی پس از اخذ اجازه از مراجع لازم ابتدا به بخش پاتولوژی بیمارستان فیروزگر و میرزا کوچک خان تهران مراجعه نموده و لیست بیماران با تشخیص CINIII و SCC مهاجم سرویکس رحم و سرویکس با تغییرات غیر تومورال از بایگانی بخش پاتولوژی استخراج گردید. سپس اسلاید‌های رنگ‌آمیزی شده H&E این بیماران از بایگانی خارج گردید با نظارت یک پاتولوژیست مجرب اسلاید‌های مناسب جهت انجام رنگ آمیزی IHC برای مارکر CD34 انتخاب گردید. بلوک‌های پارافینی مرتبط جدا شد. مارکر رنگ آمیزی CD34 با برند BIOGENIX از شرکت اکسیر ردکا خریداری شد و آزمایش ایمنو‌هیستوشیمی روی نمونه‌های بافتی پارافینی با استفاده از روش Envision method در آزمایشگاه پاتولوژی انجام گرفت. از بلوک‌های پارافینی انتخاب شده با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های بافتی به ضخامت ۳ میکرومتر تهیه گردید. سپس IHC برای مارکر CD34 انجام شد.

در این مطالعه به دلیل حساسیت تشخیص برای تفسیر از یک پاتولوژیست ماهر استفاده گردید تا میزان مثبت شدن CD34 را در سلول‌های استروما با استفاده از سیستم Scoring برآورد نماید. جهت سیستم Scoring، رنگ گرفتن کمتر از ۱۰٪ سلول‌ها در استروما معادل نتیجه منفی و رنگ گرفتن بیشتر و مساوی ۱۰٪ سلول‌ها برابر با نتیجه مثبت در نظر گرفته شد (۹). آنالیز توصیفی اطلاعات به دست آمده از نمونه‌های بیماران تحت نرم افزار SPSS 17 و با استفاده از شاخص‌های مرکزی مانند میانگین و میانه و شاخص‌های

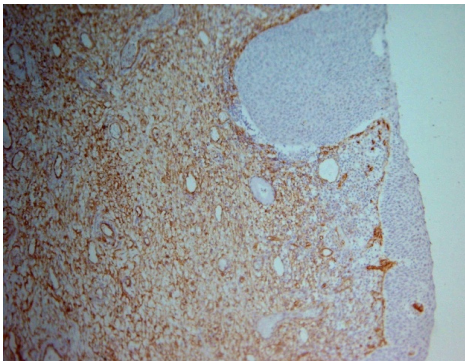
داخل دهانه رحم یک ضایعه پیش سرطانی است و مشخصه آن تکثیر غیرطبیعی سلول‌های پارابازال، ناشی از عفونت HPV است (۶) و بر اساس میزان دیسپلازی در اپیتلیوم به سه نوع I، II و III تقسیم می‌شود. این ضایعات یک مرحله قبل از کارسینوم مهاجم می‌باشند؛ که بسیاری از خصوصیات سیتولوژیک مرحله مهاجم مثل بزرگی، نامنظمی و هیپرکرومازی هسته، افزایش فعالیت‌های میتوزی و تغییر طرح بلوغ را نشان می‌دهند. در صورت عدم تشخیص و درمان در این مرحله ضایعات به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی میکرو اینویزیو پیشرفت می‌کند که حداکثر ۵ میلی‌متر به عمق و ۷ میلی‌متر در عرض رشد می‌کند (۷).

گاهی مواقع به علت وجود سلول‌های التهابی و برش نامناسب بافتی تشخیص تهاجم یعنی افتراق بین کارسینوم سلول سنگفرشی در جا از کارسینوم میکرو اینویزیو سخت می‌شود و این در حالی است که این افتراق اهمیت بسیار زیادی دارد زیرا اگر ضایعات در مرحله‌ی داخل اپیتلیال تشخیص داده شود درمان کونیزاسیون و کرایو سرجری می‌باشد، در حالی که در صورت تهاجم هم شانس متاستاز به لنف نود وجود دارد هم حداقل درمان تراکلکتومی و هیسترکتومی می‌باشد. در راستای این موضوع و جهت افتراق بهتر این ضایعات Barth در سال ۲۰۰۲ و LI در سال ۲۰۰۹ حضور مارکرهای زیستی CD34 و آلفا اکتین عضلانی صاف (α -SMA) در استرومای دهانه رحم بیماران مبتلا به نئوپلازی داخل اپیتلیالی CINIII، SCC مهاجم و افراد با سرویکس نرمال با استفاده از تکنیک ایمنو هیستوشیمی (IHC) مورد بررسی قرار دادند. این مطالعات تغییرات استرومال در سرطان‌های تهاجمی به صورت از دست رفتن بروز فیبروسیت CD34 مثبت به موازات افزایش بروز آلفا SMA در سلول‌های استروما نشان دادند (۸) و (۹).

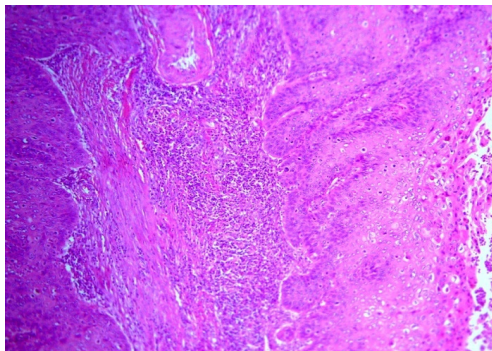
از این رو کاهش ارائه فیبروسیت‌های حاوی آنتی ژن CD34 مثبت در این مطالعه روی استرومای سرویکس و در مطالعات دیگر روی سایر بافت‌ها نشان دهنده تهاجم می‌باشد (۱۰ و ۱۱).



تصویر ۳- سرویکس با تشخیص CINII



تصویر ۴- رنگ گرفتن فیبروسیت های استرومای سرویکس با تشخیص CINIII برای مارکر CD34



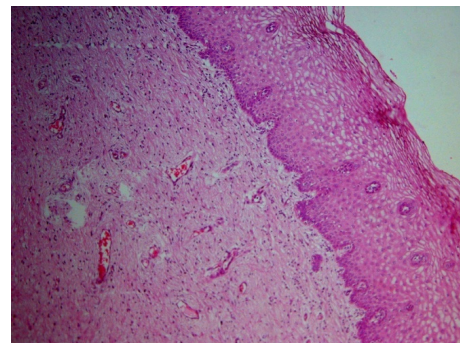
تصویر ۵- سرویکس با تشخیص کارسینوم مهاجم سنگفرشی

سال (حداقل ۲۱ و حداکثر ۸۲ سال) به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که ۱۰۰ درصد لام‌های مرتبط (۲۰ عدد) با افراد نرمال و همچنین ۱۰۰ درصد (۲۰ عدد) از نمونه‌های سرویکس انتخاب شده با وضعیت پاتولوژیک CINIII پس از رنگ آمیزی IHC برای مارکر CD34 مثبت بوده در حالی که فقط ۵۲ درصد (۱۳ عدد) از نمونه‌های افراد مبتلا به SCC از لحاظ حضور مارکر CD34 مثبت در نظر گرفته شدند (جدول ۱). اختلاف بین گروه‌های مطالعه (با توجه به وضعیت پاتولوژیکال) از نظر نشان دادن

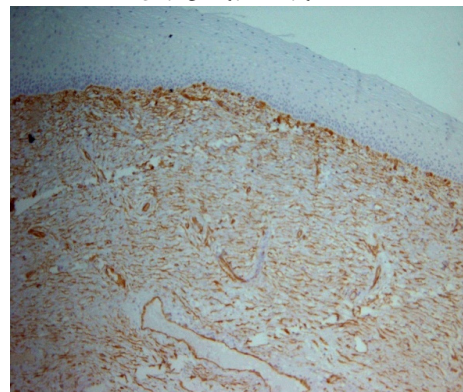
پراکندگی مانند انحراف معیار، فراوانی و درصد، انجام گرفت. همچنین برای بررسی ارتباط بین حضور و عدم حضور مارکر CD34 و وضعیت پاتولوژیکال افراد تحت مطالعه (نرمال، CINIII و SCC) از آزمون آماری مجذور کای استفاده گردید. مقادیر احتمال کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

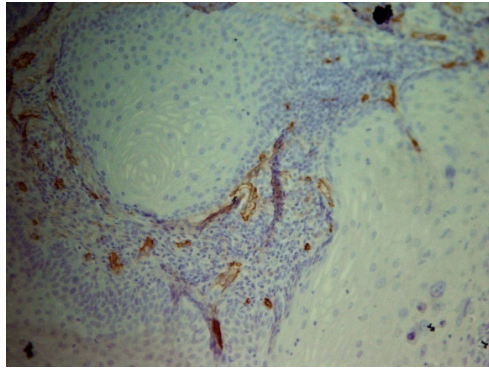
در این مطالعه نمونه‌های بافتی سرویکس ۲۰ نفر (۳۰٪/۸) با تشخیص وضعیت نرمال (تصویر ۱ و ۲)، ۲۰ نفر (۳۰٪/۸) با وضعیت CINIII (تصویر ۳ و ۴) و ۲۵ نفر (۳۸٪/۴) مبتلا به SCC (تصویر ۵، ۶ و ۷) مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران با تشخیص نرمال، $48 \pm 5/1$ سال (حداقل ۴۲ و حداکثر ۷۵)، میانگین سنی بیماران با تشخیص CINIII، $43/5 \pm 12/5$ (حداقل ۲۱ و حداکثر ۵۸ سال) و میانگین سنی افراد با تشخیص کارسینوم مهاجم، $54 \pm 10/3$ (حداقل ۴۱ و حداکثر ۸۲ سال) بود. میانگین سنی کل افراد $48/9 \pm 19/3$ سال و میانگین سنی آن‌ها $48/9 \pm 19/3$ سال و میانگین سنی آن‌ها



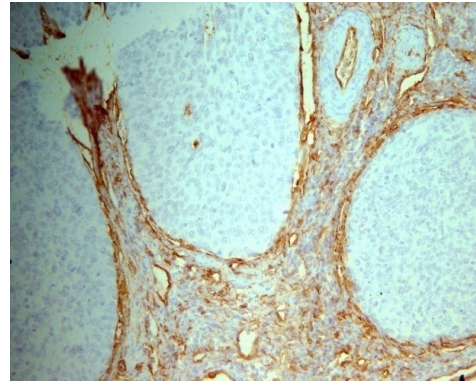
تصویر ۱- سرویکس نرمال



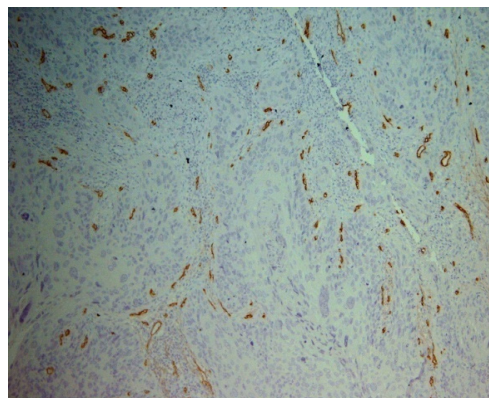
تصویر ۲- رنگ گرفتن فیبروسیت‌های استرومای سرویکس نرمال



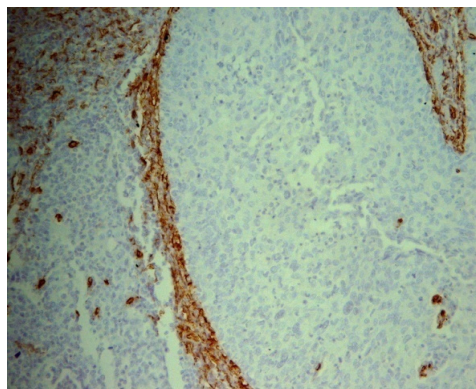
تصویر ۸- منفی شدن مارکر CD34 در استرومای سرویکس با تشخیص کارسینوم مهاجم سنگفرشی



تصویر ۶- رنگ گرفتن فیبروسیت‌های استرومای سرویکس با تشخیص کارسینوم مهاجم سنگفرشی برای مارکر CD34



تصویر ۹- نمای دیگر از کاهش مارکر CD34 در استرومای سرویکس با تشخیص کارسینوم مهاجم سنگفرشی



تصویر ۷- نمای دیگر از رنگ گرفتن فیبروسیت‌های استرومای سرویکس با تشخیص کارسینوم مهاجم سنگفرشی برای مارکر CD34

از فیبروسیت‌های + CD34 می‌باشد و به طور عمده از جمعیت میوفیبروبلاست α-SMA مثبت که تقریباً در استرومای سرویکس رحم طبیعی وجود ندارد، تشکیل شده است. از دست رفتن فیبروسیت‌های + CD34 در کارسینومای تهاجمی صرفاً مخصوص سرویکس رحم نمی‌باشد و یافته‌های مشابهی برای این تغییرات استرومایی در کارسینوم داکتال پستان (۱۱)، پانکراس (۱۳)، روده بزرگ (۱۴) و پوست (۱۵) گزارش شده است. اگر چه این پدیده به نظر می‌رسد در همه جا

مارکر CD34 به لحاظ آماری معنی دار بود. (p<۰/۰۰۱)

بحث و نتیجه‌گیری

استرومای گردن رحم حاوی مقادیر زیادی از فیبروسیت‌های CD34 مثبت می‌باشد. برای اولین بار Lindenmayer و Miettinen حضور فیبروسیت‌های + CD34 را در دهانه رحم گزارش کردند (۱۲). استرومای کارسینوم مهاجم سلول‌های سنگفرشی سرویکس رحم تقریباً عاری

جدول ۱- توزیع وضعیت پاتولوژیک گروه‌های مطالعه از نظر مثبت شدن مارکر CD 34

وضعیت مارکر CD 34						وضعیت پاتولوژیک
جمع		منفی		مثبت		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۲۰	۰	-	۱۰۰	۲۰	طبیعی
۱۰۰	۲۰	۰	-	۱۰۰	۲۰	CIN III
۱۰۰	۲۵	۴۸	۱۲	۵۲	۱۳	SCC
	۶۵		۱۲		۵۳	جمع

منابع

1. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.12. ISBN 9283204298.
2. World Health Organization. Fact sheet No. 297: "Cancer". Retrieved 2014-06-24.
3. WHO Disease and injury country estimates. World Health Organization. 2009. Retrieved Nov 11, 2009.
4. Canavan TP, Doshi NR. Cervical cancer. *Am Fam Physician*; 2000.61(5): 1369-76.
5. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, Domenici L, Riccardo Genazzani A. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecol Endocrinol*; 2011. 27 (8): 597-604.
6. Kwong RA, Nguyen TV, Bova RJ, Kench JG, Cole IE, Musgrove EA, et al. Overexpression of E2F-1 is associated with increased disease-free survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res*; 2003 Sep 1.9(10 Pt 1):3705-11.
7. Hopkins MP, Morley GW. Microinvasive squamous cell carcinoma of the cervix. *J Reprod Med*; 1994 Sep.39(9):671-3.
8. Li Q, Huang W, Zhou X. Expression of CD34, alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1 in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma of the cervix. *J Int Med Res*; 2009 Mar-Apr. 37(2):446-54.
9. Barth PJ, Ramaswamy A, Moll R. CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Arch*; 2002 Dec. 441(6):564-8.
10. Barth PJ, Schenck zu Schweinsberg T, Ramaswamy A, Moll R. CD+34 fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Virchows Arch*; 2004 Mar. 444(3):231-4.
11. Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virchows Arch*; 2002 Mar. 440(3):298-303.
12. Lindenmayer AE, Miettinen M. Immunophenotypic features of uterine stromal cells. CD34 expression in endocervical stroma. *Virchows Arch*; 1995.426:457-460.
13. Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A. CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Int J Pathol*; 2002. 440(2): 128-133.
14. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M. Differential expression of

می تواند اتفاق بیفتد اما مکانیسم ایجاد کننده ی آن هنوز به درستی شناخته نشده است. مطالعات مختلفی مانند مطالعه ی Barth و همکاران در سال ۲۰۰۲ و LI در سال ۲۰۰۹ برای بررسی میزان بروز مارکر CD34 و مقایسه ی آن در وضعیت های پاتولوژیک مختلف (نرمال، CIN III و SCC) انجام پذیرفته است (۸ و ۹).

در مطالعه حاضر ۶۵ نمونه ی بیوپسی ۲۰ عدد با وضعیت نرمال، ۲۰ عدد با وضعیت پاتولوژیکال CIN III و ۲۵ نمونه ی SCC انتخاب گردید. میانگی سنی افراد تحت مطالعه ۴۸/۹ سال و میانگی سنی آن ها ۱۹/۳ ± ۴۸/۹ سال بود. در مطالعه حاضر فراوانی حضور مارکر CD34 استفاده از تکنیک IHC نشان داد ۱۰۰ درصد نمونه های مربوط به افراد نرمال و CIN III مارکر CD34 را بروز داده اند، در حالی که برش های بافتی مربوط به کارسینومای مهاجم (SCC) کاهش ۴۸ درصدی را در میزان بروز مارکر CD34 نشان دادند (تصویر ۸ و ۹) که تأیید کننده از دست رفتن مارکر CD34 در افراد مبتلا به SCC به طور معنی دار ($p < 0.001$) می باشد و تصدیقی است بر نتایج مطرح شده توسط مطالعات Barth و همکاران در سال ۲۰۰۲ و نیز LI و همکاران در سال ۲۰۰۹ بود (۸ و ۹). از طرفی مطالعه ما نشان دهنده حضور ۵۲ درصدی فیبروبلاست های CD34+ در استرومای کارسینوم مهاجم (SCC) بود که این نسبت در مقایسه با مطالعات قبلی بسیار بالاتر می باشد و نشان دهنده این نکته مهم است که از دست دادن فیبروسیت های CD34+ در استروما می تواند نشانه ی تهاجم به استروما بوده ولی حضور فیبروسیت های CD34+ نمی تواند به طور قطع نشانه ی عدم تهاجم به استروما باشد.

در پایان پیشنهاد می گردد مطالعات گسترده تری بر روی این مارکر و مارکرهای ایمونولوژیک دیگر مانند α -SMA جهت انتخاب مارکرهای افتراقی مناسب تر صورت پذیرد.

CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumor stroma. *J Clin Pathol*; 2000. 53(8): 626-629.

15. Kirchmann TT, Prieto VG, Smoller BR. CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. *Arch Dermatol*; 1994. 130(5): 589-592.

Frequency of CD34 + fibrocytes in the stroma of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) III and invasive squamous cell carcinoma of the cervix

Ali Zare Mehrjerdi, Associate Professor in Pathology, Firouzgar Teaching Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran. Iran.

Fareme Zojaji, Kohan Pathologist, Firouzgar Teaching Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Navid Mohammadi**, Associate Professor in Preventive and Community Medicine, Faculty of medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin. Iran, & Preventive Medicine and Public Health Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). nvmohammadi@gmail.com.

Abstract

Background: Cervical cancer does not have symptoms in the early stages and almost all invasive carcinomas of the cervix have an earlier stage in which abnormal cells are confined to the epithelium. The intra-epithelial lesions associate with cytological features of invasive cancer. So, it is important to differentiate a cervical intraepithelial neoplasia (CIN) III from an invasive cervical squamous cell carcinoma (SCC).

Methods: A list of the patients with a diagnosis of CIN III, uterine cervical SCC and normal cervix was extracted from the archives of the department of pathology at two teaching hospitals in Tehran. The blocks were separated and stained slides were prepared. Appropriate blocks for immunohistochemistry (IHC) staining were chosen. The blocks were cut in 4 micrometers thickness and stained for CD34 antigen. The results were interpreted and scored by a pathologist. The data were analyzed through SPSS 17 software using descriptive and chi-square analyses.

Results: The cervical tissue sample of 65 patients were studied; 20 with normal cervix (30.8%), 20 patients with the CIN III (30.8%), and 25 patients with SCC (38.4%) with a mean age of 48.9 ± 3.19 . All slides with normal condition (20 cases), 100% of patients with CINIII (20 cases), and 52% of patients with SCC (13 cases) were positive for presence of CD34 + fibrocytes in cervical stroma ($p < 0.001$).

Conclusion: The significant relationship between the loss of CD34 antigen and pathological findings introduces the antigen as a diagnostic test for the detection of changes related to invasive carcinoma in cervix samples.

Keywords: High grade intraepithelial neoplasia (CINIII), Invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix (SCC), CD34 antigen, IHC staining