

مقایسه دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H & E) و رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی (IHC) در افتراق ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجا در بیوپسی های پستان بر اساس ضریب توافق دو پاتولوژیست

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۱۶

خلاصه

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در بین زنان به شمار می رود، امروزه مطالعات مختلفی به بررسی ارجحیت دو روش (H&E) Hematoxylin and eosin و Immunohistochemistry (IHC) در بررسی بیوپسی های پستان پرداخته اند، اما همواره تفاوت نظر بین مطالعات در این مورد وجود دارد. بنابراین در این مطالعه به بررسی مقایسه ای دو روش رنگ آمیزی (H & E) و رنگ آمیزی IHC در افتراق انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجا در بیوپسی های پستان بر اساس ضریب توافق مشاهده گر پرداختیم.

روش کار

در این مطالعه مقطعی، ۸۱ نمونه بیوپسی پستان از بیماران مبتلا به انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجا در پستان از بین بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های الزهرا، سید الشهداء و کاشانی اصفهان در طی یک دوره ۵ ساله از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ انجام گرفت. نمونه ها با استفاده از رنگ آمیزی H&E و رنگ آمیزی IHC توسط دو پاتولوژیست مشاهده گردید و میزان توافق آنها با استفاده از ضریب کاپا بررسی شد.

نتایج کار

بر اساس آزمون کاپا توافق بین دو پاتولوژیست در مورد دو رنگ آمیزی H&E ($P < 0/001$)، $kappa = 0/82$ و رنگ آمیزی IHC ($P < 0/001$)، $kappa = 0/95$ معنی دار مستقیم بود.

نتیجه گیری

با توجه به این که میزان توافق بین دو پاتولوژیست در روش رنگ آمیزی IHC بیشتر از رنگ آمیزی H&E است، به نظر می رسد روش رنگ آمیزی IHC از کارایی مطلوب تری در بررسی ضایعات پرولیفراتیک و نئوپلاستیک پستان برخوردار باشد.

کلمات کلیدی

رنگ آمیزی، سرطان پستان، ایمنوهیستوشیمی، هماتوکسیلین، ائوزین
پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

میترا حیدرپور^۱

آذر نعیمی^۲

مهديس بطلانی^{۳*}

^۱ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اصفهان، ایران.

Email: Mahdis_b2008@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان به شمار می‌آید و طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، از هر ۸ تا ۱۰ زن، یک نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شود (۱). همچنین این سرطان، دومین علت رایج مرگ در بین سرطان‌هاست. روش تشخیص سرطان پستان بیوپسی بافتی می‌باشد. در بررسی بیوپسی‌های پستان افتراق ضایعات پرولیفراتیو از نئوپلاستیک درجا از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است، چرا که روش درمان آنها کاملاً متفاوت می‌باشد. (۲). ضایعات پرولیفراتیو شامل *usual ductal hyperplasia (UDH)* و *Atypical ductal hyperplasia (ADH)* می‌باشد که هر دو دارای مشخصات مورفولوژیک خاص در رنگ آمیزی *H & E* هستند ولی بعضاً این مشخصات با هم، همپوشانی دارند. از طرفی ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجا در برخی مواقع دارای مشخصات نزدیک به هم در رنگ آمیزی *H & E* می‌باشند، لذا جهت افتراق این ضایعات از یکدیگر استفاده از رنگ آمیزی‌های تکمیلی به روش *IHC* بسیار کمک‌کننده است و در تعدادی از مطالعات استفاده از این روش‌ها میزان توافق نظر بین پاتولوژیست‌ها را افزایش داده است. در مطالعات مختلف مارکرهای مختلفی از قبیل *SMA*، کاپونین، *SMM-HC* و *P63* ... استفاده شده که در این افتراق کمک‌کننده بوده است (۳-۶).

در این مطالعه تلاش کردیم که میزان اختلاف نظر بین مشاهده گر‌ها را در افتراق انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک در بیوپسی‌های پستان بر اساس رنگ آمیزی *H&E* و *IHC* با یکدیگر مقایسه کنیم و از مارکرهای *SMA, P63, CD10*، *CK14* در افتراق ضایعات استفاده نماییم.

روش کار

در این مطالعه مقطعی، ۸۱ نمونه بیوپسی پستان از بیماران مبتلا به انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک پستان از بین بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های الزهراء، سیدالشهدا و کاشانی اصفهان در طی یک دوره ۵ ساله از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ انجام

گرفت. معیار ورود به مطالعه تمام نمونه‌های بیوپسی مناسب و قابل ارزیابی از پستان بیماران مبتلا به انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجای پستان در مکان و زمان مشخص بود. نمونه‌ها با هماتوکسیلین و آنوزین و همچنین به روش *IHC* رنگ آمیزی شد و پنل رنگ آمیزی *IHC* برای افتراق این ضایعات شامل *P63 / CK14 / CD10 / SMA* بوده است. هر پاتولوژیست به طور جداگانه ۸۱ نمونه بیوپسی پستان از بیماران مبتلا به انواع ضایعات پرولیفراتیو و نئوپلاستیک درجای پستان (*usual and atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma insitu*) را با استفاده از رنگ آمیزی *H&E* و رنگ آمیزی *IHC* مشاهده کرده و نوع آن مشخص گردیده و نتایج مشاهده‌ی دو پاتولوژیست و دو روش رنگ آمیزی با یکدیگر مقایسه گردید.

با توجه به اینکه تمامی لام‌های از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ وارد مطالعه شد و به عبارت دیگر سرشماری انجام شد نیازی به برآورد حجم نمونه در این مطالعه نبود. داده‌های این مطالعه وارد نرم افزار آماری *SPSS* شد، یافته‌ها به صورت فراوانی یا درصد نشان داده شد و همچنین جهت مقایسه یافته‌های دو مشاهده‌گر از آزمون *Cohen's kappa coefficient* استفاده شد. همچنین از آزمون *weighted kappa* نیز استفاده شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد ۸۱ مورد بیوپسی ضایعات *UDH, ADH* و *Ductal carcinoma in situ* بررسی گردید و نتایج آن در دو جدول زیر قابل مشاهده است. براساس نتایج این مطالعه، پاتولوژیست شماره ۱، ۴۶ مورد ($56/8$) *usual ductal hyperplasia* و ۲۸ مورد ($34/6$) *Atypical ductal hyperplasia* و ۷ مورد ($8/6$) *Ductal carcinoma in situ* و پاتولوژیست شماره ۲، ۴۶ مورد ($56/8$) *usual ductal hyperplasia* و ۲۸ مورد ($34/6$) *Atypical ductal hyperplasia* و ۷ مورد ($8/6$) *Ductal carcinoma in situ* در روش رنگ آمیزی *H&E* گزارش کردند (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج براساس روش رنگ آمیزی H&E

H&E	شخص دوم		داکتال	هایپرپلازی آتیپیک	داکتال	کارسینوم داکتال درجا	مجموع
	هایپرپلازی معمولی	هایپرپلازی معمولی					
	هایپرپلازی معمولی	داکتال	۴۳(٪۴۹/۴)*	۳(٪۳/۷)	۰(۰)	۴۶(٪۵۶/۸)	
پاتولوژیست اول	هایپرپلازی آتیپیک	داکتال	۳(٪۳/۷)	۲۴(٪۳۲/۹)	۱(٪۱/۲)	۲۸(٪۳۴/۶)	
	کارسینوم داکتال درجا		۰(۰)	۱(٪۱/۲)	۶(٪۷/۴)	۷(٪۸/۶)	
	مجموع		۴۶ (٪۵۶/۸)	۲۸(٪۳۴/۶)	۷(٪۸/۶)		

*تعداد(درصد)

به طور کلی فراوانی نوع تومورها در روش H&E در هر دو پاتولوژیست یکسان بود و تنها در ۸ مورد (٪۹/۸) بین دو پاتولوژیست اختلاف نظر وجود داشت و براساس آزمون کاپا توافق بین دو پاتولوژیست مطلوبی به میزان ۰٫۸۲ وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$). بنابراین روش H&E یک روش مناسب جهت تمایز ضایعات پروليفراتیو و نئوپلاستیک درجا در بیوپسی‌های پستان بود به این خاطر که ضریب توافقی بالایی داشت. با این وجود به نظر می‌رسد میزان توافق بین دو پاتولوژیست در افتراق ضایعات پستان در روش IHC بالاتر از روش H&E بود. همچنین براساس آزمون weighted kappa توافق فوق با ضریب ۰٫۹۷ و $p < ۰/۰۰۱$ بدست آمد.

به طور کلی فراوانی نوع تومورها در روش H&E در هر دو پاتولوژیست یکسان بود و تنها در ۸ مورد (٪۹/۸) بین دو پاتولوژیست اختلاف نظر وجود داشت و براساس آزمون کاپا توافق بین دو پاتولوژیست توافق مطلوبی به میزان ۰٫۸۲ وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$). بنابراین روش H&E یک روش مناسب جهت تمایز ضایعات پروليفراتیو و نئوپلاستیک درجا در بیوپسی‌های پستان بود به این خاطر که ضریب توافقی بالایی داشت. همچنین براساس آزمون weighted kappa توافق فوق با ضریب ۰٫۸۴ و $P < ۰/۰۰۱$ بدست آمد. همچنین تشخیص بر اساس رنگ آمیزی IHC توسط پاتولوژیست اول ۵۱ مورد (۶۳٪) usual ductal hyperplasia، ۲۸ مورد (۲۸٪) Atypical ductal hyperplasia و ۷ مورد (۸٪) Ductal carcinoma in situ گزارش شد و توسط پاتولوژیست دوم ۵۳ (٪۶۵/۴) مورد

جدول ۲- نتایج براساس روش رنگ آمیزی IHC

IHC	شخص دوم		هایپرپلازی داکتال	هایپرپلازی آتیپیک	کارسینوم داکتال درجا	مجموع
	هایپرپلازی داکتال	هایپرپلازی آتیپیک				
هایپرپلازی داکتال معمولی	۵۱(۶۳٪)*	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۵۱(۶۳٪)
هایپرپلازی داکتال آتیپیک	۲(٪۲/۵)	۲۱(٪۲۵/۹)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۲۳(٪۲۸/۴)
کارسینوم داکتال درجا	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۷(٪۸/۶)	۷(٪۸/۶)
مجموع	۵۳ (٪۶۵/۴)	۲۱(٪۲۵/۹)	۰(۰)	۰(۰)	۷(٪۸/۶)	

*تعداد(درصد)

بحث

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، هر دو روش رنگ آمیزی IHC و H&E روش‌های استاندارد بوده و دارای ارزش علمی هستند. همچنین در هر دو روش از نظر توافق بین پاتولوژیست از نوع مستقیم و معنی دار بوده ولی میزان توافق بین دو پاتولوژیست در روش IHC بیشتر از روش H&E بوده است به این خاطر که میزان اختلاف نظر بین دو پاتولوژیست در روش IHC کمتر از روش H&E بود و به دنبال آن ضریب کاپا در برای روش IHC بزرگتر از H&E بود. همانگونه که پیش تر صحبت شد، به کارگیری روش تشخیصی با حساسیت و ویژگی بالاتر جهت بررسی ضایعات پاتولوژی بیوپسی پستان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا با شناخت دقیق هر کدام از این روش‌ها میتوان روش مناسب‌تری که سازگاری بیشتری با شرایط داشته باشد و بیشترین دقت را ایجاد کند انتخاب نمود. که این موضوع به نوبه خود میتواند به انتخاب روش درمانی صحیح تر کمک کند (۷, ۸).

با توجه به فراوانی ضایعات پستان در زنان جامعه و همچنین تعدد ضایعات خصوصا در سنین بالا و احتمال بروز خطا و اشتباه در تشخیص و درمان به موقع، روش‌های تشخیصی مناسب از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند. یکی از روش‌های کمک کننده به افزایش دقت تشخیص در بررسی‌های پاتولوژی، استفاده از رنگ آمیزی IHC می باشد که در بسیاری از ضایعات می تواند سبب افزایش دقت و کاهش اختلاف نظر بین پاتولوژیست‌ها گردد، در این راستا نیز مطالعات متعددی صورت گرفته است.

تورکی و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ نمونه‌هایی از ضایعات سرطانی پستان را توسط دو روش IHC و روش رنگ آمیزی H&E بررسی کردند (۹). در این مطالعه ۱۱۱۶ نمونه بافتی از ضایعات از پیش تشخیص داده شده سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت به این نتیجه رسیدند که تشخیص این ضایعات توسط متد IHC و H&E به یک اندازه قابل دست یابی می باشد ($\kappa = 0.79$) و توافق بین دو پاتولوژیست حدود ۹۰ درصد ارزیابی شد. این نتایج با نتایج

مطالعه ما تا حدودی همسویی دارد چرا که ما نیز نشان دادیم هر دو روش استفاده شده در بررسی ضایعات بیوپسی شده پستان از ارزش خوبی برخوردار هستند اما از طرفی نشان دادیم که توافق دو پاتولوژیست در بررسی نمونه‌ها، در روش IHC بیشتر از روش رنگ آمیزی H&E است.

همچنین در یک مطالعه مروری که همسو با مطالعه ما بود و توسط دان کارمن انجام شده و به بررسی مارکرهای هیستوشیمیایی در تشخیص سرطان پستان انجام شده بود، به این نتیجه رسید که روش IHC یک روش جدایی ناپذیر از آزمایشگاه آسیب شناسی است به این خاطر که این روش دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و اکثر پاتولوژیست‌ها استفاده از این روش را ترجیح می دهند. از طرفی IHC یک روش مقرون به صرفه است و در تشخیص و مدیریت بیماران مبتلا به سرطان پستان بسیار موثر است. استفاده از روش IHC در تشخیص ضایعات بدخیم پستان در این مطالعه پیشنهاد داده شد (۴). در یک مطالعه دیگر نیز بیان شد که روش IHC نسبت به روش H&E روش بهتری برای تشخیص سرطان پستان بوده است و به همین دلیل بیشتر از این روش استفاده می شود (۱۰). در این مطالعه ۴۵۱ بیمار مشکوک به کارسینوم پستان مورد بررسی قرار گرفتند و در آن امتیاز میتوتیک (mitotic score) نمونه‌های بافتی توسط H&E و IHC اندازه گیری شد و نشان داده شد که دقت IHC در اندازه گیری این امتیاز و در نتیجه تشخیص ضایعات بهتر از روش H&E می باشد.

همچنین در مطالعه‌ی مروری‌ای که توسط پنگ و همکارانش انجام شد، استفاده از روش IHC برای تشخیص ضایعات پستانی و سرطان پستان روشی ارجح شناخته شده و پیشنهاد شد که استفاده از این روش می تواند جایگزین روش‌های بافت شناسی دیگر شود (۳).

از محدودیت‌های این مطالعه می توان به حجم نمونه پایین، بررسی نکردن سایر متغیرهای موثر و وجود مطالعات محدود در این زمینه اشاره کرد. قابل ذکر است از نقاط قوت این مطالعه می توان به novelty آن اشاره کرد.

نتیجه گیری

بنابراین با توجه به نتایج مطالعه ما و سایر مطالعات در این زمینه می توان نتیجه گرفت که هر دو روش IHC و H&E جهت افتراق انواع ضایعات پروليفراتیو و نئوپلاستیک در جا مفید هستند و با استفاده از هر دو روش می توان ضایعات نئوپلاستیک پستان را تشخیص داد ولی به نظر می رسد استفاده از روش IHC با توجه به توافق بیشتر بین پاتولوژیست ها ارجح باشد.

تشکر و قدردانی

تشکر از کلیه پرسنل پاتولوژی بیمارستان الزهرا اصفهان که در اجرای این مطالعه نقش داشتند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره مرجع

IR.MUI.MED.REC.1397.107 به تایید رسیده است.

منابع مالی: منابع مالی ندارد.

منافع متقابل: مولف اظهار می دارد که منافع متقابل از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

References

1. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;72(2):333-8. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
2. Zhao L, Yang X, Khan A, Kandil D. Diagnostic role of immunohistochemistry in the evaluation of breast pathology specimens. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2014;138(1):16-24. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0440-ra>
3. Peng Y, Butt YM, Chen B, Zhang X, Tang P. Update on immunohistochemical analysis in breast lesions. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141(8):1033-51. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0482-ra>
4. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2014;5(3):382.
5. Jain RK, Mehta R, Dimitrov R, Larsson LG, Musto PM, Hodges KB, et al. Atypical ductal hyperplasia: interobserver and intraobserver variability. *Modern Pathology*. 2011;24(7):917. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.66>
6. Asch-Kendrick R, Cimino-Mathews A. The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Human pathology*. 2016;48:37-47. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.035>
7. Turkki R, Linder N, Holopainen T, Wang Y, Grote A, Lundin M, et al. Assessment of tumour viability in human lung cancer xenografts with texture-based image analysis. *Journal of clinical pathology*. 2015;jclinpath-2015-202888. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202888>
8. Diaz LK, Sahin A, Sneige N. Interobserver agreement for estrogen receptor immunohistochemical analysis in breast cancer: a comparison of manual and computer-assisted scoring methods. *Annals of diagnostic pathology*. 2004;8(1):23-7. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2003.11.004>
9. Turkki R, Linder N, Kovanen PE, Pellinen T, Lundin J. Antibody-supervised deep learning for quantification of tumor-infiltrating immune cells in hematoxylin and eosin stained breast cancer samples. *Journal of pathology informatics*. 2016;7. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.189703>
10. Woo JS, Moatamed NA, Sullivan PS, Lu DY, Callahan R, Apple S. Comparison of Phosphohistone H3 Immunohistochemical Staining, Ki-67, and H&E Mitotic Count in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Breast Cancer Survival*. 2015;1(1):1.

Original Article

Comparison of two methods of hematoxylin-eosin staining (H&E) and immunohistochemistry (IHC) staining in the differentiation of proliferative and neoplastic lesions in breast biopsies based on the coefficient of agreement between the two pathologists

Received: 26/11/2019 - Accepted: 05/05/2020

Mitra heidarpour ¹
Azar Naimi ²
Mahdis Botlani ^{3*}

¹ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Medical Student, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Email: mahdis_b2008@yahoo.com

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common cancer among women. Today, various studies have examined the preference of two methods, Hematoxylin and eosin (H&E) and Immunohistochemistry (IHC) in the study of breast biopsies, but there is always a difference of opinion between them. There are studies on this. Therefore, in this study, we compared the two methods of staining (H&E) and IHC staining in differentiating different types of proliferative and neoplastic lesions in breast biopsies based on the observer agreement coefficient.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 81 breast biopsy specimens of patients with various types of proliferative and neoplastic lesions in the breast were among patients referred to Al-Zahra, Seyed Al-Shohada and Kashani hospitals in Isfahan during a 5-year period since 2014. It was done until 1397. Samples were observed using H&E staining and IHC staining by two pathologists, and their agreement was assessed using the Kappa coefficient.

Results: According to the Kappa test, the agreement between the two pathologists about H&E staining ($p < 0.001$, kappa = 0.82) and IHC staining ($p < 0.001$, kappa = 0.95) was directly significant.

Conclusion: Given that the level of agreement between the two pathologists in the IHC staining method is higher than the H&E staining, it seems that the IHC staining method has a more favorable efficiency in the study of proliferative and neoplastic breast lesions.

Key words: Coloring, Breast Cancer, Immunohistochemistry, Hematoxylin, Eosin

Acknowledgement: There is no conflict of interest.