

## مقایسه بیوپسی زیر مخاط با عضله رکتوم برای جستجوی سلول گانگلیون در تشخیص بیماری هیرشپرونک

دکتر انسیه شفیق<sup>۱\*</sup>، دکتر سپیده سیادت<sup>۱</sup>، دکتر ثمانه محمد باقرزاده تربتی<sup>۲</sup>،

دکتر رمضانعلی رضائیان جویباری<sup>۲</sup>، دکتر کریم اله حاجیان<sup>۳</sup>

۱- استادیار گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- پزشک عمومی ۳- دانشیار گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی بابل

**سابقه و هدف:** بیماری هیرشپرونک شایعترین علت انسداد دستگاه گوارش تحتانی نوزادان می باشد، که در ابتدا تنها روش تشخیص، بیوپسی تمام ضخامت رکتوم بود، سپس ساکشن بیوپسی با هزینه و عوارض جراحی کمتری ابداع شد. با توجه به اینکه در ایران هنوز برای تشخیص بیماری از روش بیوپسی تمام ضخامت استفاده می شود، این مطالعه به منظور بررسی و مقایسه بیوپسی ها از نظر وجود سلول گانگلیون در زیرمخاط و عضله انجام شده است.

**مواد و روشها:** این مطالعه مقطعی بر روی ۲۳۹ نمونه ارسالی به بخش پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی بابل طی سالهای ۸۰-۱۳۷۰ انجام شد و برشهای متوالی نمونه های بیوپسی زیرمخاط و عضله (حداکثر ۶۰ برش) مطالعه میکروسکوپی شدند.

**یافته ها:** از ۲۳۹ نمونه مورد مطالعه، ۶۱ نفر دارای بیماری تشخیص داده شدند (۱۹/۳٪) و ۱۷۲ مورد در هر دو قسمت محتوی سلول گانگلیون بودند (۵۴/۴٪). حساسیت زیر مخاط برای سلول گانگلیون ۹۶/۶٪ و همافنگی دو ناحیه در فقدان سلول ۱۰۰٪ بود. همچنین در مورد وجود سلول در دو لایه همبستگی معنی داری دیده شد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج این مطالعه که همافنگی بین برشهای متوالی عضله و زیر مخاط را از نظر وجود سلول گانگلیون نشان داد، می توان از آن در تأیید انجام روش ساکشن بیوپسی برای تشخیص بیماری بهره گرفت. همچنین فرض مساوی بودن احتمال وجود سلول در دو لایه تأیید می شود.

**واژه های کلیدی:** هیرشپرونک، بیوپسی تمام ضخامت رکتوم، سلول گانگلیون، ساکشن بیوپسی.

### مقدمه

در مواردی ممکن است فرد به سن کودکی و حتی به سن بلوغ برسد و بعد علائم در او بروز نماید. ۴۰٪ در سه ماهگی، ۲۰٪ در یک سالگی و ۱۵٪ حتی تا ۵ سالگی تشخیص داده نمی شوند (۲). هر چند در بعضی موارد در بالغین نیز گزارش شده، که بیشتر انواع آنها اکتسابی است (۳). اکثر موارد بیماری هیرشپرونک در طول دوره نوزادی یا چند ماه اول زندگی به صورت تأخیر در دفع مکنونوم، انسداد قسمت انتهائی روده، اتساع شکم، یبوست و آتروکولیت (۱) و

بیماری هیرشپرونک یا مگاکولون مادرزادی، یک اختلال ارثی است که به علت عدم حضور سلولهای گانگلیون پاراسمپاتیک در قسمتهای انتهائی دستگاه گوارش ایجاد می شود. میزان بروز بیماری تقریباً یک در ۵۰۰۰ تولد زنده است که در جنین پسر به مراتب بیش از جنین دختر (۸۵٪) می باشد. بیشتر موارد بیماری تک گیر است و حدود ۱۰٪ موارد شکل فامیلی دارد (۱). طول قطعه آگانگلیونی لزوماً وابسته به سن ظهور بیماری و شدت علائم نیست

حتی سوء تغذیه ناشی از انسداد مزمن (۴) تظاهر می نماید. این بیماری اشکال مختلف دارد.

نوع Short segment که طول قطعه بدون سلول گانگلیون ۳ cm بوده، بنابراین در صورتیکه بیوپسی خیلی بالاتر از خط دندانۀ ای برداشته شود بیماری ممکن است تشخیص داده نشود. این شکل ۶۷-۹۰٪ بیماری را شامل می شود. نوع Long segment شامل طول متغیری از کولون است ولی از سکوم فراتر نمی رود و در کمتر از ۱۰٪ بیماران است. در نوع Total تمامی کولون به همراه طول متغیری از روده باریک و حتی معده درگیر است. این نوع ۲/۶ تا ۱۴/۹٪ موارد را شامل می شود و تقریباً همیشه در هفته های اول زندگی بروز می کند و بالأخره Ultra short segment که قطعه بدون سلول گانگلیون دیده نمی شود اما بیمار علائم کلاسیک را با تأخیر و پس از سه ماهگی نشان می دهد. در این نوع، نقص در اسفنکتر آنال است و تشخیص نه به روش هیستوپاتولوژی بلکه توسط مانومتري صورت می گیرد (۵). تشخیص بیماری هیرشپرونک نیازمند تأیید عدم وجود سلول گانگلیون در شبکه عصبی لایه عضلانی (Auerbach) و زیرمخاط (Meissner) دیواره رکتوم می باشد. بررسی هیستوپاتولوژی بر روی نمونه بیوپسی عضلانی - مخاطی و یا زیر مخاطی انجام می گیرد. نمونه ها به دو روش بیوپسی تمام ضخامت و یا ساکشن بیوپسی بدست می آید، سپس مطالعه تنه های عصبی برای جستجوی سلول گانگلیون بر روی برشهای بافتی تهیه شده از نمونه های بیوپسی پس از پروسس بافتی و رنگ آمیزی به طریقه H&E انجام می شود و در صورتیکه سلول گانگلیون دیده نشود تشخیص بیماری محرز می گردد. از آنجا که رنگ آمیزی اختصاصی Karnovsky-Roots که فعالیت استیل کولین استراز را در رشته های عصبی کولینرژیک افزایش یافته در قطعه بدون سلول گانگلیون نشان می دهد، در همه مراکز پاتولوژی قابل انجام نیست، لذا مطالعه برشهای سریال با رنگ آمیزی H&E ضرورت دارد. در روش Suction biopsy نمونه باید شامل مقدار مساوی از مخاط و زیرمخاط باشد و در برشهای سریال (حداقل ۵۰ برش) بررسی انجام شود (۱). تهیه برشهای متوالی بدین منظور صورت می گیرد که در حالت طبیعی تراکم سلول گانگلیون در یک میلیتر مربع شبکه عصبی مایسنر ۱۷ عدد می باشد و در فواصل

یک میلیمتری و به شکل توده های ۵-۱ سلولی می توان آنها را دید(۶). فاصله بین سلول های گانگلیونی منفرد در قطعات گانگلیونیک کولون مبتلایان به H.D از ۱/۸ تا ۴ میلیتر (متوسط یک میلیتر) و در کودکان مبتلا به بیوست مزمن به علل دیگر، ۰/۳ تا ۶/۳ (متوسط ۱/۴۳) میلیتر می باشد(۷). همچنین محل بیوپسی حائز اهمیت است، زیرا یک ناحیه هیپوگانگلیون بطور طبیعی در مجاورت خط دندانۀ ای تا فاصله یک سانتیمتر وجود دارد لذا بیوپسی باید از فاصله ۳-۲ سانتیمتری این خط تهیه شود(۸و۶). از آنجا که در روش بیوپسی تمام ضخامت احتمال پیدایش عوارض متعدد برای بیمار وجود دارد از قبیل خونریزی و تنگی و بی اختیاری و نیز عوارض ناشی از بیپوشی عمومی، لذا روش ساکشن بیوپسی و مطالعه نمونه مخاط و زیر مخاط در سال ۱۹۶۵ ابداع گردید که هم هزینه و هم عوارض جراحی کمتری را بدنبال دارد(۶و۲). با توجه به اینکه در کشور ما هنوز برای تشخیص بیماری از روش بیوپسی تمام ضخامت رکتوم استفاده می شود، در این مطالعه برآن شدیم که بیوپسی های تمام ضخامت رکتوم را از نظر امکان وجود سلول گانگلیون در دو قسمت زیر مخاط و عضله مقایسه نموده و میزان هماهنگی وجود سلول را در این دو ناحیه برآورد نمائیم و ارزش مطالعه زیر مخاط را نشان بدهیم تا احیاناً گامی جهت تهیه امکانات ساکشن بیوپسی در مراکز درمانی کودکان برداشته شود.

### مواد و روشها

در فاصله سال های ۸۰-۱۳۷۰، ۳۱۶ نمونه بیوپسی رکتوم از کودکان مشکوک به بیماری هیرشپرونک برای آزمایش بافت شناسی به بخش پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی بابل ارسال شد که ۷۷ مورد آنها از مطالعه حذف شدند زیرا یا محل نمونه گیری نامناسب بوده (۱۶ مورد از خط دندانۀ ای و دهانه کولوستومی) و یا نمونه فقط از عضله یا زیر مخاط بود (۶۱ مورد). در ۲۳۹ مورد باقیمانده، اسلاید ها مجدداً بررسی گردیدند که لازم شد برای بعضی نمونه ها مجدداً برش متوالی تا ۶۰ برش تهیه و رنگ آمیزی H&E گردد. متوسط تعداد برش درعضله ۱۲/۹ و در زیرمخاط ۱۳/۲ برش بوده است. میکروسکوپ مورد استفاده با مارک Diastar ساخت Reichert بود. سپس داده ها با استفاده از آزمون

آماري کاي دو تجزيه و تحليل و  $p < 0.05$  معني دار تلقي شد.

### يافته‌ها

از کل ۲۳۹ نمونه که براي سلول گانگليون در دو لايه زيرمخاط و عضله مطالعه پاتولوژي انجام شد در ۱۷۲ نمونه (۷۲٪) هر دو قسمت محتوي سلول گانگليون بودند و در ۶۱ مورد (۲۵/۵۲٪) در هيچ يک از دو لايه زير مخاط و عضله، سلول گانگليون ديده نشد. همچنين در ۶ مورد (۲/۵٪) در لايه عضلاني سلول ديده شد اما زير مخاط فاقد آن بود و عکس اين موضوع يعني حضور سلول گانگليون در زيرمخاط و عدم وجود آن در لايه عضلاني در هيچ نمونه اي به چشم نخورد. از نظر آماري در مورد وجود سلول گانگليون در دو لايه عضله و زيرمخاط همبستگي معني دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). در کل ۲۳۹ نمونه ۱۶۴ مورد مربوط به جنس مذکر (۶۸/۶٪) و ۷۵ مورد مربوط به جنس مؤنث (۳۱/۴٪) بود. در گروه بيماران (۶۱ مورد)، ۲۰ بيمار دختر (۳۲/۸٪) و ۴۱ نفر پسر (۶۷/۲٪) بودند. بيماران در سنین مختلف يک روزه تا ۱۲ ساله بودند که بيشترين ميزان در سن ۴-۱ سال مشاهده شد (جدول ۱). شايع ترين علائم باليني نيز يبوست مزمن و اتساع شکم بود (جدول ۲).

#### جدول ۱. توزيع فراواني مطلق و درصد افراد مبتلا به

بيماري هيرشپرونک بر حسب سن در پرونده هاي ثبت شده در بخش پاتولوژي بيمارستان شهيد بهشتي بابل

| طي سال هاي ۸۰-۱۳۷۰ |       |       |
|--------------------|-------|-------|
| سن                 | تعداد | درصد  |
| ۱-۱۰ روزه          | ۷     | ۱۱/۵٪ |
| ۱۱-۲۰ روزه         | ۷     | ۱۱/۵٪ |
| ۲۱-۳۰ روزه         | ۵     | ۸/۲٪  |
| ۳۱ روز تا ۶ ماه    | ۹     | ۱۴/۸٪ |
| ۶-۱۲ ماه           | ۱۱    | ۱۸٪   |
| ۱-۴ سال            | ۱۲    | ۱۹/۷٪ |
| ۴-۸ سال            | ۶     | ۹/۸٪  |
| ۸-۱۲ سال           | ۴     | ۶/۶٪  |
| جمع کل             | ۶۱    | ۱۰۰٪  |

#### جدول ۲. توزيع فراواني و در صد علائم باليني در افراد مبتلا به بيماري هيرشپرونک ثبت شده در بخش پاتولوژي بيمارستان

شهيد بهشتي بابل طی سال های ۸۰-۱۳۷۰

| علائم باليني         | تعداد | درصد  |
|----------------------|-------|-------|
| يبوست مزمن           | ۲۱    | ۳۲/۴٪ |
| اتساع شکم            | ۱۴    | ۲۳٪   |
| استفراغ              | ۸     | ۱۳/۱٪ |
| تاخير دفع مکونيوم    | ۷     | ۱۱/۵٪ |
| آنوس بسته            | ۲     | ۳/۲٪  |
| انسداد روده          | ۲     | ۳/۲٪  |
| تب                   | ۱     | ۱/۶٪  |
| سوء تغذيه            | ۱     | ۱/۶٪  |
| انتروکوليت           | ۱     | ۱/۶٪  |
| پريتونيت             | ۱     | ۱/۶٪  |
| بدون علائم گزارش شده | ۲۱    | ۳۴/۴٪ |
| جمع کل               | ۶۱    | ۱۰۰٪  |

### بحث

نتايج حاصل از اين مطالعه نشان داد که ميزان حساسيت زير مخاط جهت تشخيص وجود سلول گانگليون در مقايسه با عضله ۹۶/۶٪ است و فقط در ۳/۴٪ در زير مخاط با وجود برش هاي متوالي تا ۶۰ عدد، سلول گانگليون ديده نشد، هر چند در شبکه ميانتريک سلول يافت شد. اين مسئله مي تواند به اين دلایل باشد که محل بيوپسي در نزديکي خط دنداناي (منطقه هيپوگانگليونيك) بوده، سن بيمار کم بوده (دوره نوزادي) و مهاجرت کامل سلول هاي گانگليوني از شبکه ميانتريک به زير مخاط صورت نگرفته است، دقت کافي در تشخيص سلول گانگليون بکار گرفته نشده و با لنفوسيت ها و هيستوسيت ها اشتباه شده است و دليل نارس بودن سلول گانگليون تشخيص آنها مبسر نگرديد (۱).

از جهت ديگر ميزان هماهنگي زير مخاط با عضله در فقدان سلول ۱۰۰٪ بوده است يعني با وجود برش هاي متوالي در هيچ يک از دو شبکه سلول گانگليون يافت نشد (۶۱ بيمار). از آنجا

رکتوم انجام شد و نتیجه گرفته شد که ساکشن بیوپسی روش بی ضرر، با ارزش و عملی است ولی توجه به تکنیک مهم است و برای بچه های بیش از ۶ ماه بیوپسی فنجانی اطلاعات بیشتری علاوه بر ساکشن بیوپسی بدست می دهد (۱۰). همچنین ساکشن بیوپسی همراه با لاپاراسکوپي در H.D ناحیه رکتوسیگموئید تا ۸۰٪ موارد پاسخ قطعی می دهد (۱۱).

در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۷ ارزش ساکشن بیوپسی را برای تحقیق دیسپلازی روده در ۴۱۱ بیمار بررسی کردند، ۸۴ نمونه دارای عمق کافی زیر مخاط برای بررسی بودند و ارتباط بین تغییرات بافت شناسی و علائم پایدار بیماری در آنها دیده شد (۱۲). همچنین مطالعه Puri در فاصله سال های ۸۷-۱۹۹۶، در بررسی بیوپسی تمام ضخامت یا نمونه های جراحی شده ۶۶ بیمار اختلالات حرکتی روده ای اعم از دیسپلازی عصبی، هیپوگانگلیونی، سلول های گانگلیون نابالغ، آشالازی اسفنکتر روده و فقدان سلول گانگلیون دیده شد و نتیجه نهائی به این صورت بود که با تهیه یک بیوپسی کافی با روش های بافت شناسی متفاوت می توان بیماری های شبه هیرشپرونک (از نظر بالینی) را از هیرشپرونک واقعی افتراق داد (۱۳). بیوپسی ترانس آنال رکتوم در بیماران با اختلال عصبی روده ای و آنها که بیوست مزمن مقاوم به درمان طبی داشتند دارای ارزش قابل توجهی است و مطالعه نمونه های بدست آمده از این روش در تشخیص بیماری راه گشا است (۱۴).

در این مطالعه ارتباط آماری معنی داری از نظر وجود سلول گانگلیون بین عضله و زیر مخاط یافت شد. باید توجه داشت که مطالعات تشخیصی و تحقیقاتی عمدتاً بر روی نمونه های بدست آمده از روش ساکشن بیوپسی صورت می گیرد نه بر روی بیوپسی تمام ضخامت. در ضمن از وجود تحقیق مشابهی (مقایسه زیرمخاط با عضله) در داخل ایران اطلاع دقیقی در دست نیست و لازم به یادآوری است که چون تهیه برش های متوالی از نمونه بیوپسی رکتوم و مطالعه میکروسکوپی آن به زحمت و دقت و صرف وقت فراوان نیاز دارد در مراکز عمومی پاتولوژی ایران این نوع مطالعه کمتر صورت میگیرد و عمدتاً در بیمارستان های مخصوص کودکان وابسته به دانشگاههای مادر کشور آنها با برش های کمتری انجام می شود که بالطبع از دقت کمتری برخوردار است. از آنجا که

که برای تشخیص بیماری هیرشپرونک عدم وجود سلول گانگلیون در هر دو شبکه عصبی میانتریک و مایسنر الزامی است در صورت منفی بودن هیستوپاتولوژی نمونه زیر مخاطی از نظر سلول گانگلیون، انجام اقدامات دیگری همچون بررسی رادیولوژیک روده با باریم انما و مانومتري رکتوم و رنگ آمیزی استیل کولین استراز جهت دیدن تنه های عصبی هیپرتروفیه بر روی برش های انجمادی ضرورت دارد (۱۵).

باید توجه داشت که با وجود روشهای تشخیصی مختلفی که از زمان توصیف بیماری در سال ۱۸۸۶ توسط هارولد هیرشپرونک تاکنون ابداع شده اند، ساکشن بیوپسی رکتوم امروزه مراکز پاتولوژی دنیا نقش اول را دارد و روش شناخته شده ای برای تشخیص اختلالات حرکتی روده مثل H.D می باشد (۹). رنگ آمیزی هیستوشیمی با استیل کولین استراز اجازه تشخیص سریع رشته های عصبی هیپرتروفیه را که در غیاب سلولهای گانگلیون تکثیر پیدا کرده اند داده است. آگانگلیونی برخلاف هیپوگانگلیونی و دیسپلازی عصبی با توانائی بالاتری توسط رنگ آمیزی استیل کولین استراز تأیید می شود، هرچند در مواردی که بیمار در سن بسیار تشخیص سلول های گانگلیون در زیر مخاط با برش انجمادی بسیار مشکل است و حتی با نمونه تمام ضخامت نیز مقدار بافت باید آنقدر کافی باشد تا بتوان برش های متوالی تهیه کرد. در بیماران نوع توتال آگانگلیونوزیس و نیز نوزادان ممکن است رنگ آمیزی استیل کولین استراز پاسخ منفی کاذب بدهد چون در افراد مبتلا به بیماری H.D، تنه های عصبی هیپرتروفیه دیده نمی شود (۱).

مطالعات متعددی در زمینه ساکشن بیوپسی رکتوم برای تشخیص اختلالات حرکتی روده مثل H.D انجام شده است از جمله در یک مطالعه که در سال ۱۹۹۸ صورت گرفته، در یک دوره سه ساله ۲۵۸ نوزاد و کودک جهت رد H.D و اختلالات وابسته تحت بیوپسی رکتوم قرار گرفتند، ۳۲ نفر بیماری هیرشپرونک داشتند. از ۱۴۸ بیمار که ساکشن بیوپسی شده بودند، فقط سه نفر عوارض عمده را نشان دادند. در ۱۶۸ بیمار دیگر، ۲۲ نفر دارای نمونه ناکافی بودند، در ۱۰۲ کودک بالاتر از ۶ ماه سن که بیوپسی فنجانی رکتوم برایشان انجام شد، ۹۶٪ دارای نمونه کافی بودند و هیچ عارضه واضحی در آنها یافت نشد و در ۸ بیمار بیوپسی باز

تشخیص قطعی HD بر اساس عدم وجود سلول گانگلیون در تنه های عصبی می باشد و این سلولها از تنه های عصبی لایه عضلانی به زیر مخاط مهاجرت می کنند این مطالعه نشان داد که با برشهای سریال بیوپسی زیر مخاط می توان به تشخیص قطعی رسید. در نهایت با توجه به محدودیت امکانات و عوارض ناشی از بیوپسی تمام ضخامت و نتایج بدست آمده از این مطالعه با بررسی برش های متوالی می توان برای تشخیص بیماری هیرشپرونک از ساکشن بیوپسی رکتوم به تنهایی استفاده نمود مگر در مواردی که نمونه

مربوط به نوزاد و یا مبتلایان به نوع توتال آگانگیلونوزیس باشد که این روش کفایت ندارد (۱۰ و ۱۱) در بقیه موارد مشکوک به بیماری هیرشپرونک روش ساکشن بیوپسی پاسخ قطعی بدست می دهد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی که در تهیه برش های متوالی و مجدد و رنگ آمیزی آنها دقت وافی مبذول داشته اند تشکر می نمائیم.

\*\*\*\*\*

### References

1. Stocker JT, Dehner LP. Pediatric pathology, 2nd ed, vol one, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2001; pp: 649-53.
2. Recent Advances in Histopathology 1993; 15: 234-41.
3. Munakata K, Fukuzawa M, Nmoto N. Histologic criteria for the diagnosis of allied disease of Hirschsprung's disease in adults. Eur J Pediatr Surg 2002; 12(3): 186-91.
4. Branwald E, Fauc AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine, 15th ed, North America, MC Graw Hill Co 2001; p: 1696.
5. Fenoglio Preiser CM. Gastrointestinal pathology, an atlas and text, 2nd ed, Philadelphia, Lippincott Raven 1999; pp: 597-604.
6. Whitehead R. Gastrointestinal and oesophageal pathology, 1st ed. London: Churchill Livingstone 1989, pp: 256-67.
7. Yang S, Donner LR. Detection of ganglion cells in the colonic plexuses by immunostaining for neuron-specific marker Neun: an aid for the diagnosis of Hirschsprung disease. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002; 10(3): 218-20.
8. Lall A, Gupta DK, Bajpai M. Neonatal Hirschsprung's disease. Indian J Pediatr 2000; 67 (8): 583-8.
9. Kobayashi H, Li Z, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Rectal biopsy: what is the optimal procedure? Pediatr Surg Int 2002; 18(8): 753-6.
10. Alizai NK, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? Pediatr Surg Int 1998; 13 (2-3): 121-4.
11. Yamataka A, Yoshida R, Kobayashi H, et al. Laparoscopy assisted suction colonic biopsy and intraoperative rapid acetylcholinesterase staining during transanal pull-through for Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 2002; 37(12): 1661-3.

12. Cord Udy CL, Smith VV, Ahmed S, Risdon RA, Milla PJ. An evaluation of the role of suction rectal biopsy in the diagnosis of intestinal neuronal dysplasia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997; 24(11): 1-6, 7-8.
13. Puri P. Variant Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 1997; 32(2): 149-57.
14. Simpson BB, Ryan DP, Schnitzer JJ, Flores A, Doody DP. Surgical evaluation and management of refractory constipation in older children. J Pediatr Surg 1996; 31(8): 1040-2.