

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

دکتر انسیه شفیق^{۱*}، دکتر سپیده سیادت^۱، دکتر ثمانه محمد باقرزاده تربتی^۲،

دکتر رضانعلی رضائیان جویباری^۲، دکتر کریم اله حاجیان^۳

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 هماهنگی 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 هماهنگی 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

گیر است و حدود ۱۰٪ موارد شکل فامیلی دارد(۱). طول قطعه آگانگلیونی لزوماً وابسته به سن ظهور بیماری و شدت علائم نیست 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

بیماری هیرشپرونک یا مگاکولون مادرزادی، یک اختلال ارثی است که به علت عدم حضور سلولهای گانگلیون پاراسمپاتیک در قسمتهای انتهایی 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

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 می‌گیرد که در حالت طبیعی تراکم سلول گانگلیون در یک میلیمتر مربع شبکه عصبی مایسنر ۱۷ عدد می‌باشد و در فواصل یک میلیمتری و به شکل توده‌های ۵-۱ سلولی می‌توان آنها را دید (۶). فاصله بین سلول‌های گانگلیونی منفرد در قطعات گانگلیونیک کولون مبتلایان به H.D از ۰/۱۸ تا ۴ میلیمتر (متوسط یک میلیمتر) و در کودکان مبتلا به بیوست مزمن به علل دیگر، ۰/۳ تا ۶/۳ (متوسط ۱/۴۳) میلیمتر می‌باشد (۷). همچنین محل بیوپسی حائز اهمیت است، زیرا یک ناحیه هیپوگانگلیون بطور طبیعی در مجاورت خط دندان‌های 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 بی‌اختیاری 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 می‌شود، در این مطالعه برآن شدیم که بیوپسی‌های 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 سال‌های ۸۰-۱۳۷۰، ۳۱۶ نمونه بیوپسی رکتوم از کودکان مشکوک به بیماری هیرشپرونک برای آزمایش بافت‌شناسی به بخش پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی بابل ارسال شد که ۷۷ مورد آنها از مطالعه حذف شدند زیرا یا محل نمونه‌گیری نامناسب بوده (۱۶ مورد از خط دندان‌های ای و دهانه

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 مکنونیوم، انسداد قسمت انتهائی روده، اتساع شکم، بیوست و آنتروکولیت (۱) و حتی سوء تغذیه ناشی از انسداد مزمن (۴) تظاهر می‌نماید. 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 دندان‌های برداشته شود بیماری ممکن است تشخیص داده نشود. این شکل ۹۰-۶۷٪ بیماری را شامل می‌شود. نوع Long segment شامل طول متغیری از کولون است ولی از سکوم فراتر نمی‌رود 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 می‌شود و تقریباً همیشه در هفته‌های اول زندگی بروز می‌کند و بالأخره Ultra short segment که قطعه بدون سلول گانگلیون دیده نمی‌شود اما بیمار علائم کلاسیک را با تأخیر و پس از سه ماهگی نشان می‌دهد. در این نوع، نقص در اسفنکتر آنال است و تشخیص نه به روش هیستوپاتولوژی بلکه توسط مانومتری صورت می‌گیرد (۵). تشخیص بیماری هیرشپرونک نیازمند تأیید عدم وجود سلول گانگلیون در شبکه عصبی لایه عضلانی (Auerbach) و زیرمخاط (Meissner) دیواره رکتوم می‌باشد. بررسی هیستوپاتولوژی بر روی نمونه بیوپسی عضلانی - مخاطی و یا زیر مخاطی انجام می‌گیرد. نمونه‌ها به دو روش بیوپسی تمام ضخامت و یا ساکشن بیوپسی بدست می‌آید، سپس مطالعه تنه‌های عصبی برای جستجوی سلول گانگلیون بر روی برشهای بافتی تهیه شده از نمونه‌های بیوپسی پس از پروسس بافتی و رنگ آمیزی به طریقه H&E انجام می‌شود و در صورتیکه سلول گانگلیون دیده نشود تشخیص بیماری محرز می‌گردد. از آنجا که رنگ آمیزی اختصاصی Karnovsky-Roots که فعالیت استیل کولین استراز را در رشته‌های عصبی کولینرژیک افزایش یافته در قطعه بدون سلول گانگلیون نشان می‌دهد، در همه مراکز پاتولوژی قابل انجام نیست، لذا مطالعه برشهای سریال با رنگ آمیزی H&E

۵	۳۰-۲۱ روزه	۸/۲٪
۹	۳۱ روز تا ۶ ماه	۱۴/۸٪
۱۱	۶-۱۲ ماه	۱۸/٪
۱۲	۱-۴ سال	۱۹/۷٪
۶	۴-۸ سال	۹/۸٪
۴	۸-۱۲ سال	۶/۶٪
۶۱	جمع کل	۱۰۰٪

جدول ۲. توزیع فراوانی و در صد علائم بالینی در افراد مبتلا به

بیماری هیرشپرونک ثبت شده در بخش پاتولوژی بیمارستان

شهید بهشتی بابل طی سال های ۸۰-۱۳۷۰

علائم بالینی	تعداد درصد
یبوست مزمن	۲۱ ۳۲/۴٪
اتساع شکم	۱۴ ۲۳٪
استفراغ	۸ ۱۳/۱٪
تأخیر دفع مکنونیم	۷ ۱۱/۵٪
آنوس بسته	۲ ۳/۲٪
انسداد روده	۲ ۳/۲٪
تب	۱ ۱/۶٪
سوء تغذیه	۱ ۱/۶٪
انتروکولیت	۱ ۱/۶٪
پریتونیت	۱ ۱/۶٪
بدون علائم گزارش شده	۲۱ ۳۴/۴٪
جمع کل	۶۱ ۱۰۰٪

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان حساسیت زیر مخاط جهت تشخیص وجود سلول گانگلیون در مقایسه با عضله ۹۶/۶٪ است و فقط در ۳/۴٪ در زیر مخاط با وجود برش های متوالی تا ۶۰ عدد، سلول گانگلیون دیده نشد، هر چند در شبکه میانتریک سلول یافت شد. این مسئله می تواند به این دلایل

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 آماری کای دو تجزیه و تحلیل و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

از کل ۲۳۹ نمونه که برای سلول گانگلیون در دو لایه زیرمخاط و عضله مطالعه پاتولوژی انجام شد در ۱۷۲ نمونه (۷۲٪) هر دو قسمت محتوی سلول گانگلیون بودند و در ۶۱ مورد (۲۵/۵۲٪) در هیچ یک از دو لایه زیر مخاط و عضله، سلول گانگلیون دیده نشد. همچنین در ۶ مورد (۲/۵٪) در لایه عضلانی سلول دیده شد اما زیر مخاط فاقد آن بود و عکس این موضوع یعنی حضور سلول گانگلیون در زیرمخاط و عدم وجود آن در لایه عضلانی در هیچ نمونه ای به چشم نخورد. از نظر آماری در مورد وجود سلول گانگلیون در دو لایه عضله و زیرمخاط همبستگی معنی 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 بیماران (۶۱ مورد)، ۲۰ بیمار دختر (۳۲/۸٪) و ۴۱ نفر پسر (۶۷/۲٪) بودند. بیماران در سنین مختلف یک روزه تا ۱۲ ساله بودند که بیشترین میزان در سن ۴-۱ سال مشاهده شد (جدول ۱). شایع ترین علائم بالینی نیز یبوست مزمن و اتساع شکم بود (جدول ۲).

جدول ۱. توزیع فراوانی مطلق و درصد افراد مبتلا به

بیماری هیرشپرونک بر حسب سن در پرونده های ثبت

شده در بخش پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی بابل

طی سال های ۸۰-۱۳۷۰

سن	تعداد	درصد
۱-۱۰ روزه	۷	۱۱/۵٪
۱۱-۲۰ روزه	۷	۱۱/۵٪

باشد که محل بیوپسی در نزدیکی خط دندان‌های (منطقه هیپوگانگلیونیک) بوده، سن بیمار کم بوده (دوره نوزادی) و مهاجرت کامل سلول‌های گانگلیونی از شبکه میانتریک به زیر مخاط صورت نگرفته است، دقت کافی در تشخیص سلول گانگلیون بکار گرفته نشده و با لنفوسیت‌ها و هیستوسیت‌ها اشتباه شده است و بدلیل نارس بودن سلول گانگلیون تشخیص آنها میسر نگردید (۱).

از جهت دیگر میزان هماهنگی زیر مخاط با عضله در فقدان سلول ۱۰۰٪ بوده است یعنی با وجود برش‌های متوالی در هیچ یک از دو شبکه سلول گانگلیون یافت نشد (۶۱ بیمار). از آنجا که برای تشخیص بیماری هیرشپرونک عدم وجود سلول گانگلیون در هر دو شبکه عصبی میانتریک و مایسز الزامی است در صورت منفی بودن هیستوپاتولوژی نمونه زیر مخاطی از نظر سلول گانگلیون، انجام اقدامات دیگری همچون بررسی رادیولوژیک روده با باریوم انما و مانومتري رکتوم و رنگ آمیزی استیل کولین استراز جهت دیدن تنه‌های عصبی هیپرتروفیه بر روی برش‌های انجمادی ضرورت دارد (۱۰۵).

باید توجه داشت که با وجود روشهای تشخیصی مختلفی که از زمان توصیف بیماری در سال ۱۸۸۶ توسط هارولد هیرشپرونک تاکنون ابداع شده‌اند، ساکشن بیوپسی رکتوم امروزه مراکز پاتولوژی دنیا نقش اول را دارد و روش شناخته شده‌ای برای تشخیص اختلالات حرکتی روده مثل H.D می باشد (۹). رنگ آمیزی هیستوشیمی با استیل کولین استراز اجازه تشخیص سریع رشته‌های عصبی هیپرتروفیه را که در غیاب سلولهای گانگلیون تکثیر پیدا کرده‌اند داده است. آگانگلیونی برخلاف هیپوگانگلیونی و دیسپلازی عصبی با توانائی بالاتری توسط رنگ آمیزی استیل کولین استراز تائید می شود، هرچند در مواردی که بیمار در سن بسیار پائین است تشخیص سلول‌های 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 برش‌های 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، تنه‌های 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 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 بچه‌های بیش از ۶ ماه بیوپسی فنجانی اطلاعات بیشتری علاوه بر ساکشن بیوپسی بدست می دهد (۱۰). همچنین ساکشن بیوپسی همراه با لاپاراسکوپی 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 سال‌های ۸۷-۱۹۹۶، در بررسی بیوپسی تمام ضخامت یا نمونه‌های جراحی شده ۶۶ بیمار اختلالات حرکتی روده‌ای اعم از دیسپلازی عصبی، هیپوگانگلیونی، سلول‌های 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 روش‌های بافت شناسی متفاوت می توان بیماری‌های شبه هیرشپرونک (از نظر بالینی) را از هیرشپرونک واقعی افتراق داد (۱۳). بیوپسی ترانس آنال رکتوم در بیماران با اختلال عصبی روده‌ای و آنها که بیوست مزمن مقاوم به درمان طبی داشتند دارای ارزش قابل توجهی است و مطالعه نمونه‌های بدست آمده از این روش در تشخیص بیماری راه گشا است (۱۴).

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.

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 تشخیص قطعی HD بر اساس عدم وجود سلول گانگلیون در تنه های عصبی می باشد و این سلولها از تنه های عصبی لایه عضلانی

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.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، بیمارستان شهید بهشتی، گروه پاتولوژی، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۵۲۰۷۱-۴.