

Hirschsprung hastalığında sinir pleksusu ve ganglion hücresi dağılımının ölçümsel analizi

Quantitative analysis of distribution of nerve fibers and ganglion cells in Hirschsprung's disease

Safiye Aktaş¹ Ragıp Ortaç¹ Cüneyt Günşar² İrfan Karaca²

Dr Behçet Uz Çocuk Hastanesi Alsancak-İzmir

¹Patoloji Laboratuvarı ²Çocuk Cerrahisi Servisi

Özet: Bu çalışmanın amacı, Hirschsprung Hastalığı (HH) olgularında ganglion pozitif ve aganglionik segmentlerin submukoza ve muskuler tabakalarında sinir pleksusu dağılım farklılıklarını ayrı ayrı, ölçümsel olarak saptamak; ayrıca olguların ganglion pozitif segmentteki ganglion hücre ve pleksus dağılımlarını kontrol gurubu ile karşılaştırmaktır. Dr Behçet Uz Çocuk Hastanesinde 1992-1998 yılları arasında HH tanısıyla izlenen 1 ay-8 yaş arasında 17 erkek ve 3 kız çocuğuna; ve yaş ortalamaları benzer 15 otopsi olgusuna ait rektosigmoid bölge ya da kolondan hazırlanan H.E. boyalı kesitlerde okülometre ile ölçüm yapılmıştır. Birim alana düşen pleksus sayısı, pleksus alanı oranı, ganglion sayısı, pleksus başına ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısı submukoza ve muskuler tabakalar için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Kontrol gurubuyla HH olgularının ganglion pozitif ve negatif alanlarının ayrı ayrı olarak muskuler tabakalarında alan başına düşen pleksus sayısı, ayrıca HH ganglion pozitif alanlar ile yine kontrol gurubu arasında alan ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısı muskuler tabakalarda kontrol gurubunda daha fazla olmak üzere farklı bulunmuştur. Submukoza tüm parametreler için; HH olgularının ganglion pozitif ve negatif alanları kendi aralarında istatistiksel farklılık içermemektedir. Bu bulgular eşliğinde bu seride, HH'ında submukozada pleksus hipertrofinin mutlak olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hirschsprung hastalığı, morfo-metrik ölçüm

Summary: The aim of this study is to determine the quantitative differences of nerve fiber distribution, in both submucosal and muscular layers, between ganglion positive and negative segments of Hirschsprung's Disease (HD) cases; and to compare the number of ganglion cells in the positive segment of the cases with the control group. This study includes 20 cases (17 male, 3 female), 1 month-8 years of age, followed up and treated in Dr Behçet Uz Children's Hospital between 1992 and 1998. The control group is 15 autopsy cases of the same age group. The quantitation is performed on hematoxylin and eosin stained sections of rectosigmoid or colonic tissues by oculometer. The number of nerve fibers, the ratio of nerve fiber area, the number of ganglion cells, per unit area; and number of ganglion cells per number of nerve fiber and nerve fiber area was calculated for both submucosal and muscular layers. The number of nerve fibers per unit area was statistically different between ganglion positive and negative areas of muscular layers of the HD and control group cases. The number of ganglion cells per unit area and per unit nerve fiber area in muscular layers were higher in control group cases than ganglion positive areas of HD cases. There were no statistical differences for the same parameters in submucosal layers. The microscopic findings in the proximal segment of aganglionic area and the value of nerve fiber hypertrophy in HD were discussed.

Key Words: Hirschsprung's disease, morphometric analysis

Hirschsprung Hastalığı (HH) bağırsaklarda ganglion hücre yokluğu ve hipertrofik sinir pleksusları varlığı ile belirli bir hastalıktır (1, 2). Beş bin canlı doğumda 1 oranında ve erkeklerde daha sık görülür. %75 rektosigmoid bölgede saptanır. Nadiren total kolonik aganglionosis olabilir (3). Yeni doğan döneminde intestinal obstrüksiyon ile klinik görünüm sergiler (1). Etiyolojisi kesinlik kazanmamıştır. Başlangıçta ganglion hücrelerin yokluğu, nöral krest hücrelerinin göç kusuruna bağlanmıştır, ancak son çalışmalar hücrelerin göç ettiğini, ancak canlı kalamadığı ya da diferansiye olamadığını ileri sürmektedirler (1). Hipertrofik sinir pleksusu varlığı tanıyı destekleyen önemli bir bulgu olmakla birlikte, literatürde tüm olgularda olup olmadığı konusunda bilgiye rastlanmamıştır.

HH'in genetik zemininin araştırılmasında gelişmeler vardır, ancak tek bir kromozom ya da gen defekti saptanmamıştır (1). Olguların çoğunluğunun multigenik ve multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (2, 4, 5). Down sendromu en sık birlikte olduğu kromozom anomalisidir. Waardenburg sendromu (sağırılık, pigment bozuklukları) ile birlikte olabilmektedir (2).

HH'da tanısal sorunlar yaşanabilmektedir. Aganglionik bölgenin yaygınlığı seromusküler biopsilerde hematoksilin eozin boyalı kesitler ile ganglion hücre aranmasına dayandığı gibi; frozen kesitlerde asetil kolinesteraz dokukimyasal boyanma yöntemi ile tanı daha basit ve güvenilirdir (3, 6, 7). Nitrik oksit sentaz ya da NADPH diaforaz dokukimyası da tanıda yardımcıdır (8, 9).

Stereolojik yöntemler, 3 boyutlu mikroskopik yapıların basit ve etkin yöntemlerle sayılandırılmasını amaçlar. Volum, yüzey alanı ve uzunluk temel yöntemlerle ölçülür (10). Hücrelerin, elemanların, yapıların boyutları; sinapslar, nöronlar, kanser hücreleri, glomerül korpüskülleri, ovarian follikülleri içeren birçok değişik histolojik antite ölçülmektedir (11).

Morfometrik ölçümler hipoganglionozisde ayırıcı tanı için kullanılmaktadır (12). HH'da "western blot analysis" yöntemi ile sinaptik vezikül proteini antikoru kullanılarak barsak duvarına sinir fibrillerinin uzanım miktarı kantitatif olarak araştırılmaktadır (13).

Bu çalışmanın amacı, çocukluk çağı HH olgularında ganglion negatif ve pozitif segmentler arasındaki submukoza ve muskuler tabakalarda ayrı ayrı, sinir pleksusu dağılım farklılıklarını ölçümsel olarak saptamak; ayrıca olguların ganglion pozitif segmentteki ganglion

hücre ve pleksus dağılımlarını kontrol grubu ile karşılaştırmaktır.

Gereç ve yöntem

Dr Behçet Uz Çocuk Hastanesinde 1992-1998 yılları arasında HH tanısıyla izlenen 1 ay-8 yaş arasında 17 erkek ve 3 kız çocuğuna ve yaş ortalamaları benzer gastrointestinal patolojik bulgusu olmayan 15 otopsi olgusuna ait olgularımıza yaklaşık eşdeğer rektosigmoid ve kolon bölgelerinden hazırlanan H+E boyalı kesitlerde ışık mikroskopta bir okülere yerleştirilen okülometre ile 40 büyütme plan objektifte ölçüm yapılmıştır. Bu 20 olgu aşamalı ya da primer opere edilmiş olguları kapsamaktadır. Tüm katları içeren 1cm'den büyük dokular yeterli kabul edilmiştir. Bu (1-2 cm) dokularda ölçüm ve sayım yapılmıştır.

Her olgu için 1-4 bloktan hazırlanan H+E boyalı kesitlerin tümünde ölçüm yapılmıştır. Aynı elemanları yeniden saymamak için bir kesitte bir alanda sayım yapıldı. Birim alana düşen pleksus sayısı, pleksus alanı oranı, ganglion sayısı, pleksus başına ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısı submukoza ve muskuler tabakalar için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Sonuçlar IBM uyumlu bilgisayarda SPSS programında Mann Whitney U nonparametrik testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Ayrıca hastalıklı bölge proksimalindeki bulguları hastalığın seyri ile, klinik bulgularının başlangıcı ile ölçümsel analiz yapılan örneğin elde edildiği operasyon arasındaki süre, bulgularla karşılaştırılmıştır ve 0.05'den küçük P değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

Kontrol kümesi 1 ay -8 yaş arasındadır, ancak 11 kız, 4 erkek olgu içermektedir. Bu yaş kümesinde ve bu konuda bu cins farkı göz ardı edilmiştir. Kontrol kümesi olgular GIS ile ilgili patolojisi olmayan başka nedenle yitirilmiş olgulardır. Rekto-sigmoid bölge ya da inen kolondan 1-2 cm tüm katları içeren örnekler alınmıştır. HH olgularının ganglion olumlu (+) alanların örnekleri tutulan segmentin 2-2.5 cm proksimalinden alınmıştır.

Bulgular

Yirmi olgunun %85'i erkek çocuğudur. Yaş ortalaması 15 (±19.28) aydır. Ortanca yaş 4 aydır. Olguların tümü rektosigmoid yerleşimli kısa segment olgularıdır. Yedi olguda stoma açılmaksızın primer pull through Duhamel-Martin operasyonu uygulanmıştır. Onüç olguda evreli

ameliyat yapılmıştır. Olguların hiçbirinde HH'a yönelik aile öyküsü yoktur. Bir olguda Down sendromu saptanmıştır. Ortalama izlem süresi 45.3 aydır (14-89). Klinik gidiş postoperatif darlık gelişen 2 ve enterokolit gelişen 2 olgu dışında sorunsuzdur. Ölçümsel bulguların karşılaştırmalı ortalamaları Tablo IV'de verilmiştir. Kontrol grubuyla HH olgularının ganglion pozitif ve negatif alanlarının ayrı ayrı olarak muskuler tabakalarında alan başına düşen pleksus sayısı, ayrıca HH ganglion pozitif alanlar ile yine kontrol kümesi arasında

alan ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısı muskuler tabakalarda kontrol kümesinde daha çok olmak üzere farklı bulunmuştur. Submukoza tüm parametreler için; HH olguların ganglion negatif (-) ve pozitif (+) alanları kendi aralarında istatistiksel farklılık içermemektedir. Submukozal ganglion negatif (-) alan Resim 1 ve 2'de, pozitif alan Resim 3'de, muskuler ganglion pozitif alan Resim 4'de izlenmektedir.

Tablo I. Submukozal tabakada HH olgularının ganglion pozitif (+) ve negatif (-) alanları ile kontrol olgularının birim alana düşen pleksus sayısı (NPA) ve birim alana düşen pleksusu alanı (APA) ortalamalarının karşılaştırılması

	HH (Ganglion +) (n=20)	Kontrol (Otopsi) (n=15)	HH (Ganglion -) (n=20)	p
NPA	7.45	1.25	2.11	0.7
p		0.7	0.8	
APA	6.34	5.65	13.81	0.4
p		0.4	0.12	

Tablo II. Muskuler tabakada HH olgularının ganglion pozitif (+) ve negatif (-) alanları ve kontrol olgularının NPA ve APA ortalamalarının karşılaştırılması

	HH (Ganglion +) (n=20)	Kontrol (Otopsi) (n=15)	HH (Ganglion -) (n=20)	p
NPA	1.43	2.06	1.42	0.3
p		0.3	0.18	
APA	22.32	28.70	26.50	0.03
p		0.03	0.01	

Tablo III. HH olgularının proksimal ganglion pozitif (+) alanları ile kontrol kümesi arasında submukozal tabakada pleksus başına düşen ganglion sayısı (NGNP), alan başına düşen ganglion sayısı (NGA) ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısı (NGAP) ortalamalarının karşılaştırılması

	HH (Ganglion +) (n=20)	Kontrol (Otopsi) (n=15)	p
NGNP	1.21	1.50	0.14
NGA	1.62	17.19	0.17
NGAP	36.41	35.96	0.12

Tablo IV. HH ganglion pozitif (+) alan ile kontrol kümesi arasında muskuler tabakada NGNP; NGA ve NGAP ortalamalarının karşılaştırılması

	HH (Ganglion +) (n=20)	Kontrol (Otopsi) (n=15)	p
NGNP	1.52	1.87	0.12
NGA	2.09	3.99	0.01
NGAP	10.53	16.87	0.02

Tartışma

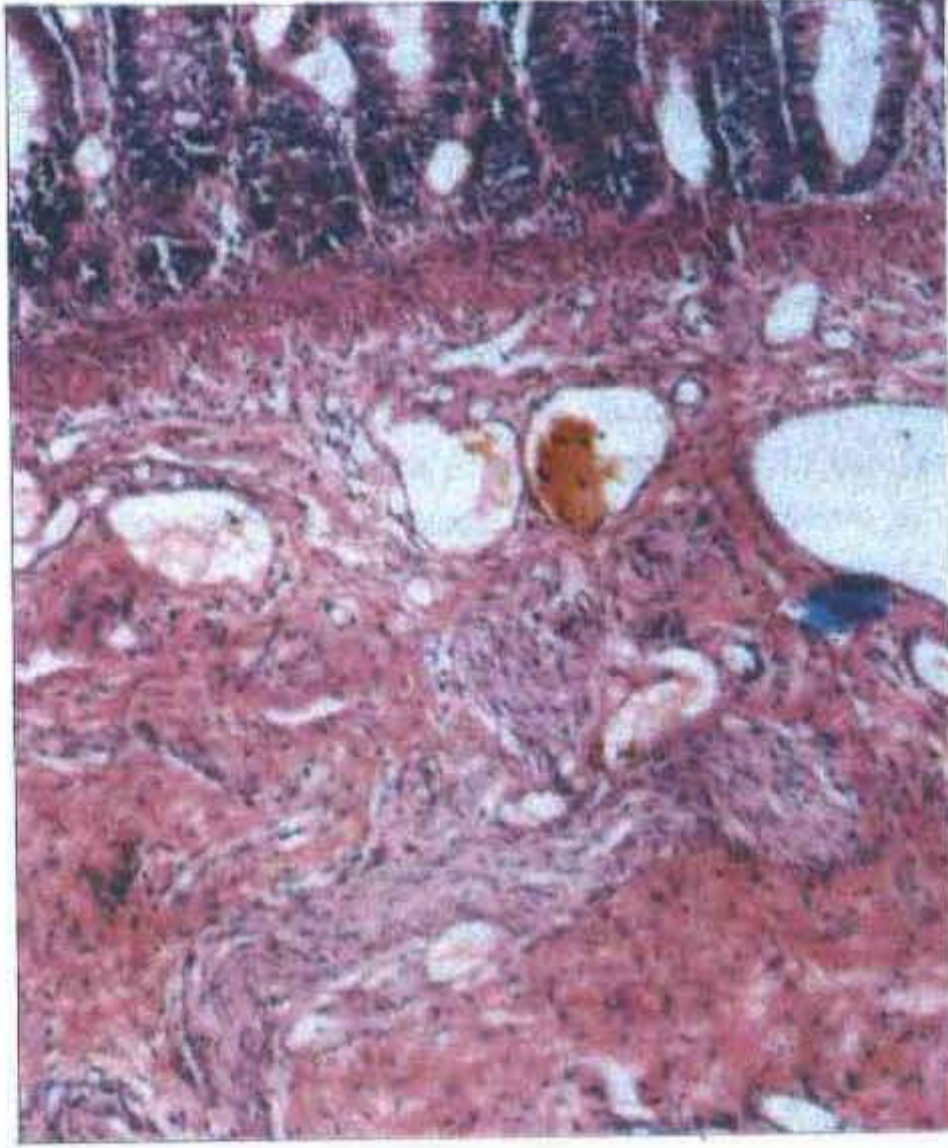
HH'da ve varyantları ile ilgili morfometrik ölçümlere ilişkin çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Tanı güçlükleri ve varyantları ile ayırıcı tanısı gereken HH'da daha fazla diagnostik ölçümlere ve kriterlere gereksinim vardır.

HH'da tanısal biopsiler genellikle rektumdan alınmakta olup çoğunlukla muskuler tabakayı içermemektedir. Bu nedenle submukoza ve muskuler tabakadaki özelliklerin ayrı ayrı tanımlanması önem taşımaktadır.

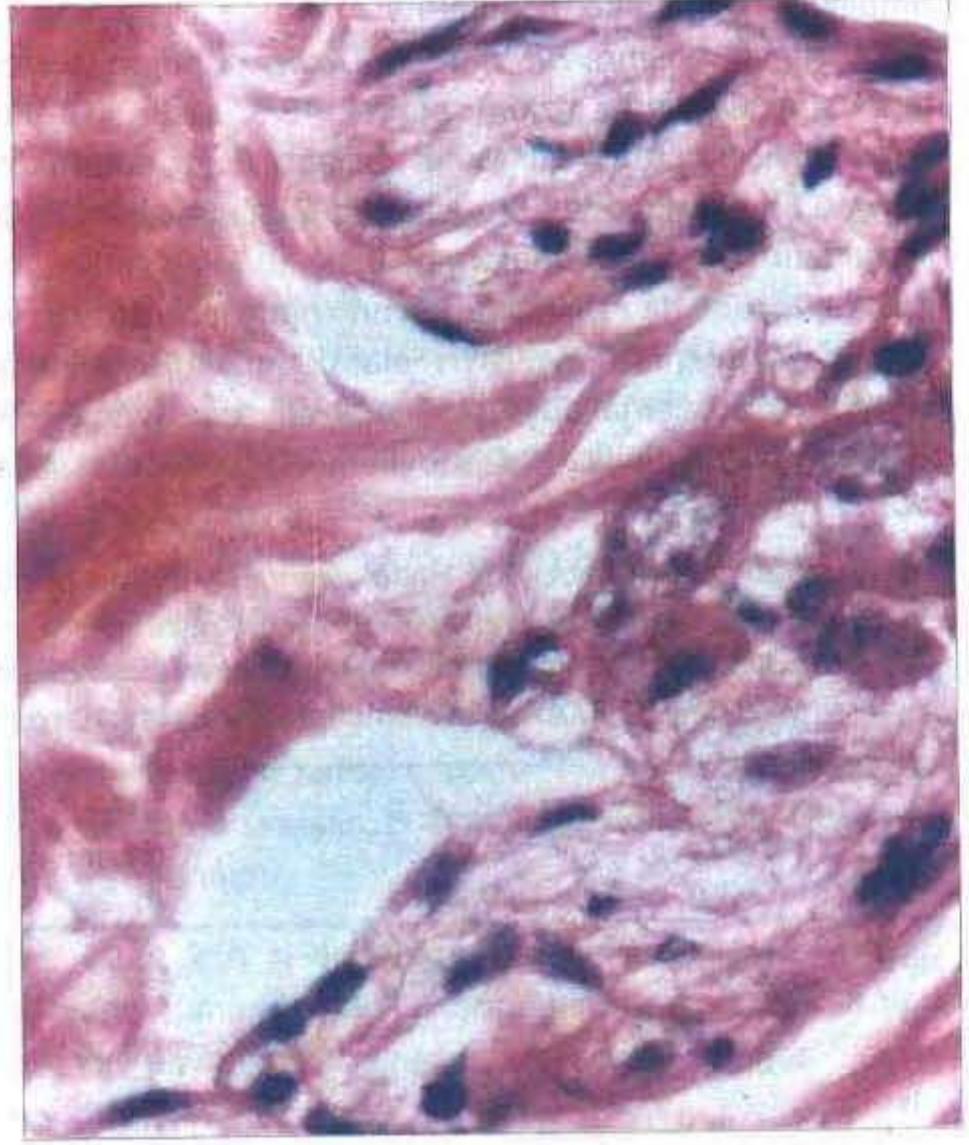
Literatürde ölçümsel çalışmaların bazıları hipoganglionosis hakkındadır. Hipoganglionosis ile otopsi kontrollerinin karşılaştırılması ile ilgili bir çalışmada, normal kolonda myenterik pleksusta longitudinal ve horizontal kesitlerin H+E boyalı kesitlerinin incelenmesinde milimetre başına 7 ganglion hücresi saptanmıştır (12).

HH'nin proksimal normal alanlarındaki hücre sayısı hipoganglionosis ile karşılaştırılmış ve hipoganglionosiste daha az saptanmıştır. Scharli ve arkadaşları bu hipoganglionosis olgu serilerindeki ölçümlerini optik elektronik görüntü analizi sistemi ile gerçekleştirmişlerdir (12).

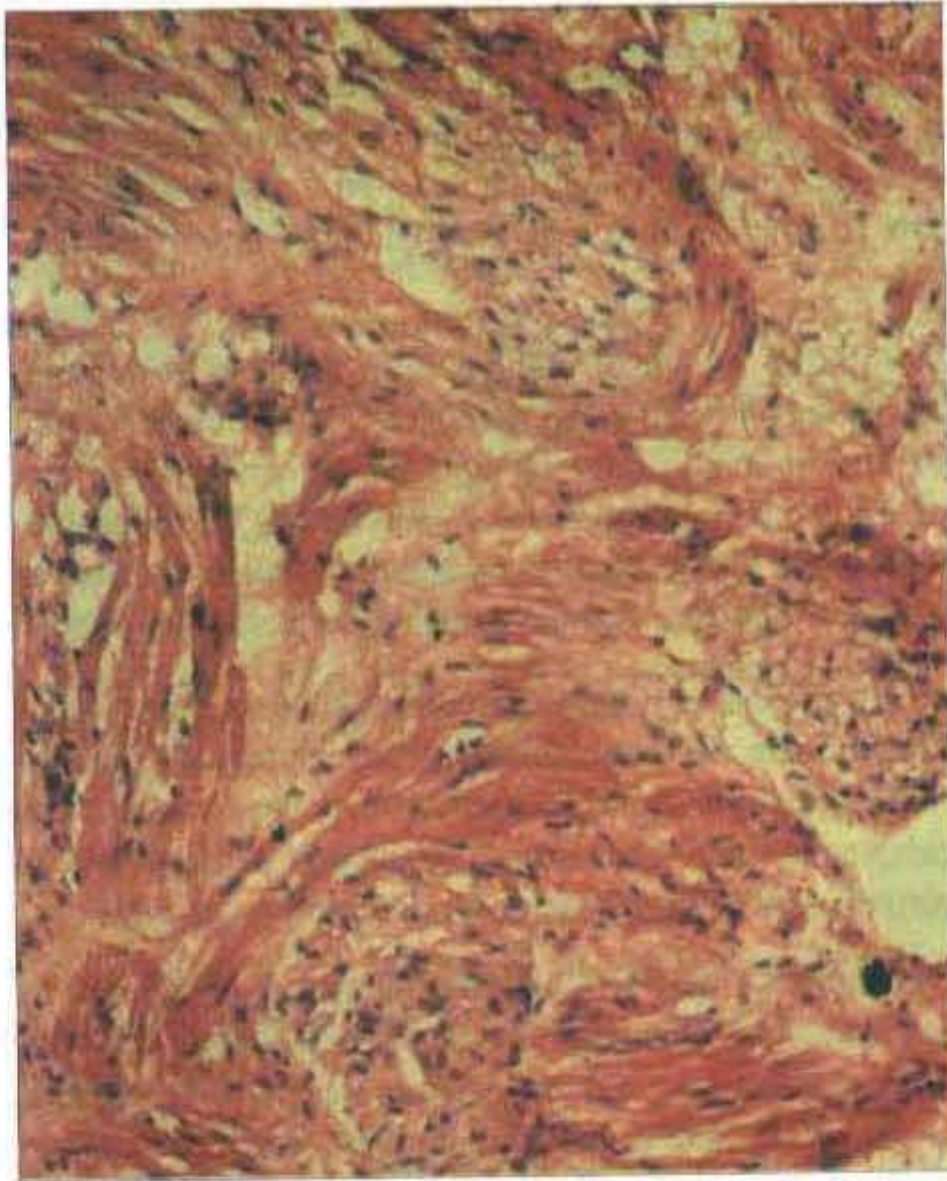
Yamakata ve ark. HH olan 12 olguda aganglionik ve ganglion pozitif alanlardan operasyon sırasında elde edilip -80 C'de saklanan dokularda western blot analiz ile sinaptik vezikül proteini araştırmışlar ve HH'da belirgin düşük bulmuşlardır. Bu protein immun dokukimyasal araştırıldığında sinir fibrillerinin aganglionik bölgede barsak duvarında sonlanmadığını göstermiştir (13).



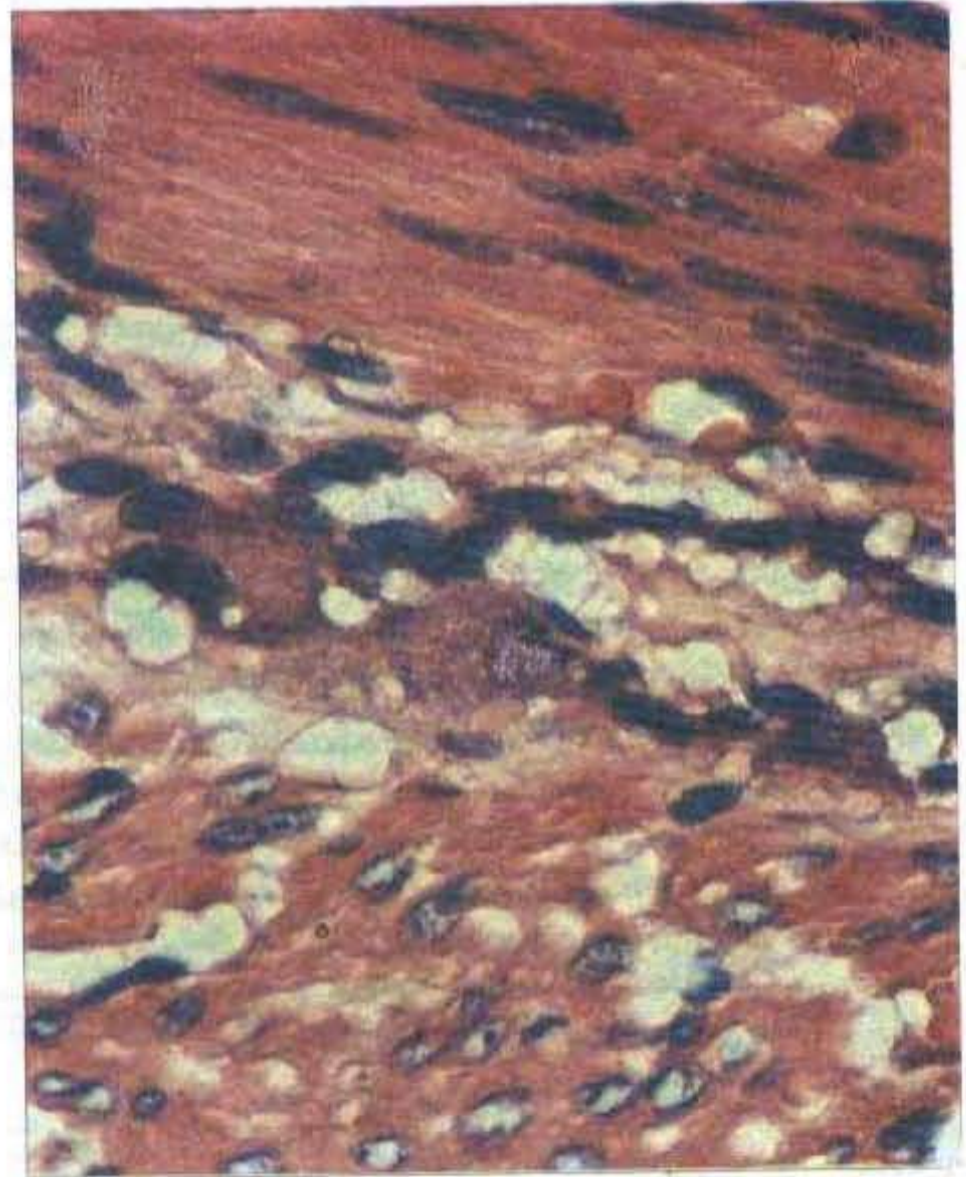
Resim 1. Submukozal aganglionik pleksuslar (H+E x40)



Resim 3. Submukozal ganglion içeren pleksuslar (H+E x400)



Resim 2. Muskuler tabakada aganglionik pleksuslar (H+E x100)



Resim 4. Muskuler tabakada ganglion içeren pleksuslar (H+E x400)

HH ve varyantları geniş bir histopatolojik spektrum sergilerler. Hipoganglionozis üzerinde yeterince çalışılmamış, tam olarak anlaşılmamıştır (14). HH'da kısa bir aganglionik segment proksimalinde pleksus hipertrofisi ve ganglion hücre sayısı artışı mı görülür yoksa hipoganglionosis mi saptanır sorusu tartışma konusudur. Bu iki durumun klasik HH ve HH ilişkili hipoganglionosis olarak ayrılması söz konusu olabilir. HH ilişkili hipoganglionosisin gerçekten ayrı bir hastalık mı, yoksa HH'da pleksus hipertrofisi ve ganglion hücre sayısı artışı öncesi bir geçiş periodu mu olduğu tartışılmalıdır.

Bu sorulara yanıt aramak için hastalıklı bölge proksimalindeki bulguları hastalığın seyri ile karşılaştırdık. Ancak klinik bulgularının başlangıcı ile ölçümsel analiz yapılan örneğin elde edildiği operasyon arasındaki sürenin bu bulgularla istatistiksel ilgisi saptanmadı. HH ve ilgili hastalıklar temelde kesin tanı için biopsi ve patolojik inceleme gerektirmelerinin yanı sıra, artık ölçümsel tanı gerektiren antiteler olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır.

Morfometrinin patolojide birçok alanda uygulanmaya başlanması, birçok konuda yararının araştırılıyor olması,

yine birçok konuda (tümör volümü saptanması, angiogenez ölçümü, immun dokü kimyasal ekspresyonların kantitasyonu gibi) rutin ve araştırmalarda yerini almış olması bizi HH'ında morfometrinin değerini araştırmaya yönlendirmiştir.

HH olgularının elektron mikroskopik incelendiği bir çalışmada, hipertrofik pleksusta; endonörium, perinörium ve hipertrofik sinir pleksusuna komşu alanlarda kollagende artma saptanmıştır (15). Yazarlar aganglionik barsak histopatolojisinin yalnızca sinir dokusu değişiklikleriyle sınırlı olmadığı ve bağ dokusu komponentlerinde de artma görüldüğü yorumuna varmışlardır.

Çalışmamızda, muskuler tabakada alan ve birim pleksus alanı başına düşen ganglion sayısının ve birim alan başına düşen pleksus alanının kontrol grubunda HH tutulan segmentin hemen proksimaline göre daha yüksek olması, reaktif ganglion sayısı artışı yerine, tutulan segmentten normale doğru az sayılı bir geçiş yorumunu getirmektedir. Submukozal tabakada alan başına düşen pleksus ve pleksus alanının kontrol gurubu ve aganglionik HH alanlarında fark içermemesi HH hastalığında pleksus hipertrofisinin mutlak olmadığı yorumunu getirmektedir.

Kaynaklar

1. Puri P, Ohshiro K, Wester T. Hirschsprung's disease: A search for etiology. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 140-147.
2. Puri P. Hirschsprung's disease and rectal disorders recent progress. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 137-180.
3. Jasonni VV, Martucaello G. Total colonic aganglionosis. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 174-180.
4. Moore SW, Johnson AG. Hirschsprung's disease: Genetic and functional associations of Down's and Wardenburg Syndromes. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 156-161.
5. Kusafuka T, Puri P. Genetic Aspect of Hirschsprung's Disease. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 148-155.
6. Kabayashi H, Wang Y, Hirakawa H, O'Briain DS et al. Inoperative evaluation of extent of aganglionosis by rapid acetyl cholinesterase histochemical technique. *J Ped Surg* 1995; 30:2 48-252.
7. Huntley CC, Shaffner LS, Challa VR, Lyerly AD. Histochemical diagnosis of Hirschsprung's disease. *Pediatrics* 1982; 69: 755-760.
8. Kabayashi H, Puri P. NADPH-Diaphorase Histochemistry: a reliable test for the intraoperative diagnosis of Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 1996; 31: 1552-1553.
9. Kabayashi H, Miyano T, Yumataka A, Lane GJ et al. Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders. *J Ped Surg* 1997; 32: 38-40.
10. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM et al. The new strereological tools: director, fractionner, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-881.

11. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N et al. Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-394.
12. Scharli AF, Sossai R. Hypoganglionosis. *Sem Ped Surg* 1998; 7: 187-191.
13. Yamataka A, Nagaoka I, Miyeno T, Yanai T, et al. Quantitative analysis of neuronal innervation in the aganglionic Bowel of patients with Hirschsprung's Disease. *J Ped Surg* 1995; 30: 260-263.
14. Meier-Ruge WA, Brunner LA, Engert J, Heminghaus M et al. A Correlative morphometric and clinical investigation of hypoganglionosis of the colon in children. *Eur J Pediatr Surg* 1999; 9: 67-74.
15. Wedel Th, Holschneider A M, Krammer H J. Ultrastructural features of nerve fascicles and basal lamina abnormalities in Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg* 1999; 9: 75-82.

Yazışma Adresi:

Dr Safiye AKTAŞ
Dr Behçet Uz Çocuk Hastanesi
Patoloji Laboratuvarı, Alsancak-İZMİR
1430 sok. No 2/1 Daire: 3 Alsancak / İZMİR
Tel (İş) : 0 232 - 489 56 56-362
Tel (Ev): 0 232 - 464 10 45
Faks : 0 232 - 489 23 15
eoaktaş@yahoo.com eoaktaş@hotmail.com