

Hirschsprung hastalığındaki kantitatif morfolojik değişikliklerin immunohistokimya eşliğinde dijital morfometrik ölçümü

DIGITAL MORPHOMETRIC MEASUREMENT OF QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL CHANGES WITH IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN HIRSCHSPRUNG DISEASE

Sümeyye EKMEKÇİ¹, Mustafa OLGUNER², Erdener ÖZER³

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Hirschsprung hastalığı 5000 doğumda bir görülme sıklığıyla önemli bir çocukluk dönemi hastalığıdır. Morfolojik tanı altın standart olup cerrahi tedaviyi önemli derecede etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı; morfolojik değişikliklerin dijital morfometrik olarak kantifiye edilmesi ve patolojik incelemenin tanılal katkısının geliştirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Bu prospektif çalışmaya; hastanemizde klinik olarak Hirschsprung tanısı alan 7 olgu dahil edildi. Olgularda immunohistokimya eşliğinde submukozal alanda ve muskularis propriadaki sinir pleksuslarının ortalama maksimum çapı ve sayısı, transizyonel zonda eozinofil lökositlerin sayısı ve damar değişikliklerinin varlığı morfometrik olarak incelenmiştir.

Bulgular: PGP 9.5 immunohistokimyasal boyaması ile submukozal pleksus başına düşen ortalama ganglion sayısı 1.1 ile 12.9 arasında değişiyordu. Ganglionik zondaki submukozal ve myenterik pleksuslarda ortalama ganglion hücre çapı hipoganglionik kısımdaki pleksuslardaki ortalama ganglion hücre çapından daha büyüktür ($p=0.002$, $p=0.002$). Ganglion sayısı da ganglionik zonda hipoganglionik zona göre daha fazladır ($p=0.003$, $p=0.002$). H&E boyalı kesitlerde submukozal pleksus ortalama çapı sırasıyla ganglionik, geçiş ve aganglionik zonlar için istatistiksel olarak anlamlı şekilde 32.8μ , 58.9μ ve 84.0μ ($p<0.001$); myenterik pleksus için ise 42.2μ , 77.4μ ve 96.1μ dur ($p<0.001$). Geçiş zonundaki myenterik pleksuslarda eosinofilik infiltrat 6 olguda (%85.7) saptandı. C-kit immunohistokimyasal boyamasında muskularis propriadaki Cajal hücre dansitesi her üç zonda anlamlı farklılık göstermedi. Kalretinin immunohistokimyasal boyamasında, lamina propriada ve submukozada kolinerjik sinir fibrillerinin aganglionik zonda anlamlı olarak ortadan kalktığı gözlemlendi ($p<0,001$).

Sonuç: Hirschsprung hastalığının histolojik tanısında morfometrik kantifikasyon ve kalretinin immunohistokimyası yararlı yöntemlerdir. Özellikle submukozal alanda ganglion hücresi sayısı ve pleksus çapının değerlendirilmesi önemlidir.

Anahtar Sözcükler: dijital patoloji, Hirschsprung hastalığı, immunohistokimya, morfometri

Sümeyye EKMEKÇİ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Patoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

 <https://orcid.org/0000-0003-1607-500X>

ABSTRACT

Objective: Hirschsprung disease is an important childhood disease with an incidence of one per 5000 births. Morphological diagnosis is the gold standard and plays a crucial role on the prognosis of surgical treatment. The purpose of this study is to quantitate the morphological changes using digital morphometry and improve the histological diagnostic impact for this disease.

Material and Method: This retrospective study enrolled seven cases of resection material due to the diagnosis of Hirschsprung disease. The mean maximum diameter and number of nerve plexuses in the submucosal area and muscularis propria, the number of eosinophil leukocytes and the presence of vascular changes in the transition zone were evaluated morphometrically using immunohistochemistry.

Results: PGP 9.5 immunostaining showed that the mean ganglion cell number per submucosal plexus ranged between 1.1 and 12.9. The mean ganglion cell diameter in the submucosal and myenteric plexus in ganglionic is greater than the mean ganglion cell diameter in the hypoganglionic plexus ($p=0.002$, $p=0.002$). The number of ganglion is also higher in the ganglionic zone than in the hypoganglionic zone ($p=0.003$, $p=0.002$). H&E stained sections revealed that the mean submucosal plexus diameter in the ganglionic, transition and aganglionic zones was 32.8μ , 58.9μ and 84.0μ , respectively ($p<0.001$); whereas for the myenteric plexus 42.2μ , 77.4μ and 96.1μ respectively ($p<0.001$). Eosinophilic infiltrate in the myenteric plexus of the transition zone was found in six cases (85.7%). Cajal cell density evaluated with c-kit immunohistochemistry in the muscularis propria was not significantly different in any of three zones. Calretinin immunohistochemical staining showed that cholinergic nerve fibrils both in the lamina propria and submucosa of the aganglionic zone were significantly absent ($p<0.001$).

Conclusion: Morphometric quantification and calretinin immunohistochemistry is a useful method in the diagnosis of Hirschsprung disease. Especially evaluation of the submucosal ganglion cell number and plexus diameter appears to be valuable.

Keywords: digital pathology, Hirschsprung disease, immunohistochemistry, morphometry

Hirschsprung hastalığı (HH) 5000 doğumda bir görülme sıklığıyla önemi bir çocukluk dönemi hastalığıdır (1-4). Erkek/kadın oranı yaklaşık 4/1'dir (3). Hasta yönetiminde patolojik incelemenin önemi büyüktür. Ganglion hücrelerinin sayısal özellikleri, gangliaların yapısal değişiklikleri, enterik sinir fibrillerinin miktarı ve Cajal hücrelerinin sayısı cerrahinin başarısını etkilemektedir (5). Bu açıdan nesnel ve bilimsel ölçütlere ihtiyaç bulunmaktadır.

HH olan hastalar, altta yatan nörolojik sorunun patolojik tanısına yetecek miktarda doku sağlayacak bir dizi cerrahi girişim geçirebilirler. Hastaların cerrahi yöntemlerle elde edilen patolojik materyallerinde, enterik sistemin hücresel ve dokusal komponentleri ile ilişkili bir dizi morfolojik değişiklikler gözlenmektedir. Bu değişiklikler; parasempatik ganglion hücrelerini, gangliaları, kolinerjik sinir fibrillerini ve interstisyel Cajal

hücrelerini ilgilendirmektedir (5-9). Morfolojik tanı kriterlerinin kantitatif tanımlanması durumunda gereksiz ve yetersiz cerrahi biyopsi ve rezeksiyon yapılması riski vardır. Bu çalışmanın amacı, morfolojik tanı kriterlerinin kantifikasyonu ve aynı zamanda bu kriterleri değerlendirmek açısından yeterli ve minimal cerrahi yük gerektirecek patoloji materyallerinin tanımlanmasıdır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar; genel olarak kantitatif tanımlanan bu değişikliklerin kantitatif olarak belirlenmesini sağlayarak, daha nesnel ve kanıta dayalı veri elde edilmesine ve patolojik incelemenin tedavi yönteminin prediksyonuna yapacağı katkının geliştirilmesine öncülük edecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu prospektif çalışmaya; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2015-2017 yılları arasında, klinik olarak HH tanısı alan ve rutin "transanal pull-

through” cerrahi materyali patolojik inceleme için gönderilen 7 olgu dahil edilmiştir. Olguların 4’ü erkek, 3’ü kızdır. Hasta yaşı 2 ay ile 7 ay arasında değişmekte olup, ortalama 3 aydır. Bu olgulara ait rezeksiyon materyalleri (7 ile 24 cm, ortalama 13,7 cm uzunlukta) rutin incelemede olduğu gibi proksimalden distale haritalanarak örneklenmiştir (Resim 1). Rutin hematoksilin ve eozin (H&E) yanısıra immunohistokimyasal boyamalar ile aşağıda tanımlanan morfolojik parametreler; ışık mikroskobuna eklenen dijital kamera sistemi ile kantitatif olarak ölçülmüştür. H&E boyalı kesitlerde; submukozal alanda ve muskularis propriadaki sinir pleksuslarının ortalama maksimum çapı ve 10 mm² başına düşen sayısı, proksimal cerrahi sınırda eozinofil lökositlerin sayısı ve damar değişikliklerinin varlığı incelenmiştir.



Resim 1: Cerrahi spesimenin makroskopik görünümü ve üzerinde işaretlenen örnekleme alanları

İmunohistokimyasal incelemelerde protein gen protein 9.5 (PGP 9.5) boyalı kesitlerde submukozal alanda sinir pleksusu başına düşen ortalama ganglion sayısı ve maksimum çapı, C-kit boyalı kesitlerde muskularis propriada Cajal hücrelerinin dansitesi ve kalretinin boyalı kesitlerde ise lamina propriada ve submukozada kolinerjik sinir fibrillerinin boyanma dansitesi incelenmiştir. C-kit

boyalı kesitlerde Cajal hücrelerinin dansitesi +, ++, +++ olarak (10, 11), kalretinin boyalı kesitlerde kolinerjik sinir fibrillerinin boyanması var ya da yok olarak skorlanmıştır (12).

Çalışmaya alınan 7 olguya ait 83 H&E ile boyalı kesit Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkartılmış ve tekrar incelenmiştir. İmmunhistokimyasal boyama için seçilen preparatlara ait parafin bloklarından, lizinli lamlara 4 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Hazırlanan kesitlere PGP 9.5, kalretinin ve c-kit (Ventana, monoclonal mouse, dilüsyon 1:50) antikorları kullanarak Ventana Benchmark XT otomatik boyama cihazında standart boyama prosedürü uygulanmıştır. Hücrelerde izlenen kahverengi boyanma pozitif boyanma olarak kabul edilmiştir. İşaretlenen alanlardaki kantitatif ölçüm, Olympus BX1 ışık mikroskobuna bağlı Olympus SC50 kamera ile elde edilen dijital görüntülerin Olympus CellSens Standard 1.14 programı ile değerlendirmesi sonucunda gerçekleştirilmiştir. Ganglion sayısının %40 dan fazla azaldığı bölgeler geçiş zonu ya da hipoganglionik zon olarak kabul edilmiştir. Elde edilen kantitatif ve kalitatif verilerin, topografik olarak ayrılan aganglionik, geçiş ve ganglionik zonlarda karşılıklı istatistiksel ilişkisi değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde Ki-Kare Testi ve bağımsız örneklem T testi, Pearson ve Kendall’s korelasyon analizleri kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

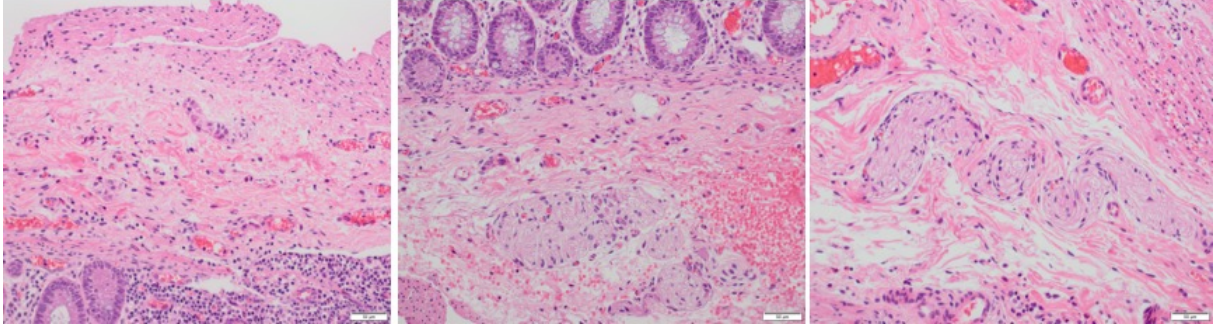
BULGULAR

Çalışmamızda hem submukozal hem de myenterik pleksus çapları her üç zon için anlamlı olarak farklı bulundu (Tablo I, Resim 2). Ganglionik segment için submukozal ve myenterik pleksus çapları sırayla $32,8 \pm 6,5 \mu$ ve $42,2 \pm 4,8 \mu$ iken, hipoganglionik zon için $58,9 \pm 1,8 \mu$ ve $77,4 \pm 2,0 \mu$, aganglionik segment için $84,0 \pm 6,0 \mu$ ve $96,1 \pm 6,5 \mu$ idi ($p < 0,001$). Buna karşın hem submukozal hem de myenterik pleksusların sayıları her üç segment için anlamlı farklılık göstermemekteydi (Tablo II). Ganglionik segment için submukozal ve myenterik pleksus sayıları sırayla $2,8 \pm 0,2$ ve $7,2 \pm 0,9$ iken, hipoganglionik zon için $2,9 \pm 0,3$ ve $7,5 \pm 0,6$, aganglionik segment için $2,8 \pm 0,5$ ve $7,3 \pm 0,4$ idi (sırasıyla, $p = 0,83$, $p = 0,64$).

Tablo I. H&E boyalı kesitlerde sinir pleksuslarının ortalama çapları (μ)

Olgu No	Submukozal Pleksus			Myenterik Pleksus		
	GZ	HGZ	AGZ	GZ	HGZ	AGZ
1	28,8	59,0	89,3	37,8	75,0	98,5
2	40,5	60,3	88,3	45,9	77,9	97,6
3	39,9	60,1	86,4	48,9	80,3	93,2
4	27,7	58,3	80,8	45,7	77,5	96,5
5	27,9	59,7	85,7	42,9	76,8	94,7
6	39,0	60,0	86,1	39,0	79,5	99,9
7	26,3	54,9	71,9	35,7	74,8	92,6

***GZ:** Ganglionik Zon, **HGZ:** Hipoganglionik Zon, **AGZ:** Aganglionik Zon



Resim 2: Ganglionik zona ait kesitlerde submukozal sinir pleksus çapları, diğer zonlara göre daha küçük boyutta (sol), hipoganglionik zona ait kesitlerde submukozal sinir pleksuslarında pleksus çapları, ganglionik zona göre daha büyük, aganglionik zona göre daha büyük boyutta(orta), Aganglionik zona ait kesitlerde submukozal sinir pleksuslarında pleksus çapları, diğer zonlara göre daha büyük (sağ). (H&E, x200)

Tablo II. H&E boyalı kesitlerde ortalama submukozal ve myenterik sinir pleksusu sayısı

Olgu No	Submukozal Pleksus (n/10mm ²)			Myenterik Pleksus (n/10mm ²)		
	GZ	HGZ	AGZ	GZ	HGZ	AGZ
1	29,7	28,0	33,4	76,7	83,6	78,1
2	30,0	33,5	32,4	75,4	79,4	75,4
3	29,0	30,3	28,6	76,6	77,0	69,6
4	27,6	28,5	24,3	69,8	76,5	68,4
5	26,9	25,9	25,2	56,9	66,6	69,1
6	32,0	34,5	33,1	86,8	78,8	80,4
7	23,6	24,8	20,3	66,6	68,7	72,7

***GZ:** Ganglionik Zon, **HGZ:** Hipoganglionik Zon, **AGZ:** Aganglionik Zon

H&E boyalı kesitlerde proksimal cerrahi sınırda (geçiş zonunda) morfoloji değerlendirildiğinde, myenterik pleksuslarda eozinofil lökosit varlığı 6 olguda (%85,7) saptanır iken, submukozal arteriyel fibromusküler displazi hiçbir olguda izlenmedi.

Çalışmamızda pleksuslardaki ganglion sayısı ve çapı değerlendirildiğinde, ganglionik ve hipoganglionik zonalarda anlamlı farklılık saptandı. Ganglionik zondaki submukozal ve myenterik pleksuslarda ortalama ganglion hücre çapı, anlamlı fark gösterir şekilde sırasıyla $18,2 \pm 1,5 \mu$ ve $17,4 \pm 1,5 \mu$ iken, hipoganglionik kısımda $9,0 \pm 0,8 \mu$ ve $8,9 \pm 0,1 \mu$ idi (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$) (Tablo III, Resim 2). Yine ganglionik kısımdaki submukozal ve myenterik pleksuslarda ortalama ganglion hücre sayısı anlamlı olarak farklı saptandı. Ganglionik zon için sırasıyla $6,4 \pm 1,9$ ve

$7,3 \pm 0,9$ iken, hipoganglionik kısım için $2,6 \pm 0,7$ ve $2,9 \pm 0,4$ bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,002$).

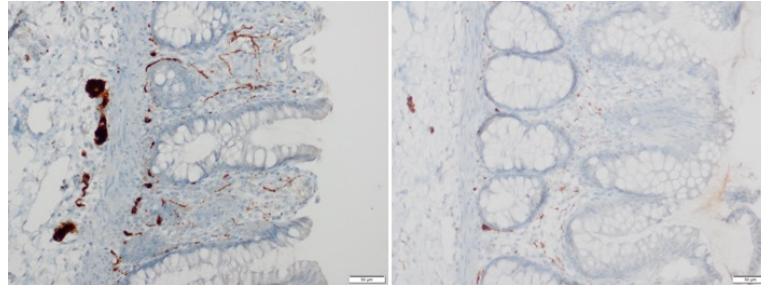
Çalışmamızda Cajal hücre dansitesini değerlendirmek için yaptığımız c-kit immunohistokimyasal boyamasında ganglionik kısımda ++ boyanma %85 vakada görülürken, hipoganglionik zonda bu boyanma tüm vakalarda ve aganglionik kısımda ise %71 vakada saptandı. Bu açıdan istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,17$).

Kalretinin immunohistokimyası her üç zon için anlamlı farklılık ortaya koydu ($p<0,001$). Ganglionik kısımda çoğunlukla kuvvetli pozitif boyanma var iken, hipoganglionik kısımda bu boyanma pozitifitesi azalmakta idi (Resim 3), aganglionik kısımda ise tüm vakalarda kalretinin immunohistokimyası negatif boyanma gösterdi.

Tablo III. Sinir pleksus (submukozal ve myenterik) başına düşen ortalama maksimum ganglion hücre çapları (μ)

Olgu No	Submukozal Pleksus (μ)		Myenterik Pleksus (μ)	
	GZ	HGZ	GZ	HGZ
1	17,8	8,7	15,5	7,6
2	17,9	8,9	17,2	8,4
3	18,6	8,5	16,5	7,9
4	18,3	8,7	19,5	8,1
5	19,0	9,7	17,8	10,0
6	20,5	10,6	19,3	9,7
7	15,5	8,3	16,4	9,9

*GZ: Ganglionik Zon, HGZ: Hipoganglionik Zon, AGZ: Aganglionik Zon



Resim 3: Lamina propria ve submukozada kalretinin boyanma durumu. Solda ganglionik zonda (+++), sağda hipoganglionik zonda (++) . (DAP, x200).

TARTIŞMA

HH'nin tipik klinik bulguları mekonyum geç çıkışı, abdominal distansiyon ve ciddi kronik kabızlıktır (1, 2, 6). Tüm HH olgularının %80 - 90' ı semptomatiktir ve yenidoğan döneminde teşhis edilmektedir (6). Embriyonik gelişimin 6 - 12. haftası boyunca, nöral krest kök hücreleri, myelin ve submukozal pleksusu oluşturmak için bağırsağa göç eder. Bu göç HH' de bloke olur (9, 13). HH hem sporadik hem de ailesel farklı duyarlılık genlerini içeren karmaşık bir genetik etyolojiye sahip olup multifaktöriyeldir (3, 14, 15).

HH, patolojik açıdan distal bağırsağın myenterik ve submukozal pleksuslarında ganglion hücrelerinin yokluğu ile karakterize konjenital bir malformasyondur (2, 3, 7, 8). Çoğunlukla aganglionosis rektum veya rektosigmoid bölgeyi içerir, ancak aganglionosis kolonun farklı segmentlerine de uzanabilir ve olguların %5 - 10' unda tüm kolon veya hatta önemli miktarda ince bağırsak tutulumu gözlenir (1 - 3).

HH'nin kesin tanısı rektal biyopsi ve histopatolojik inceleme ile konur (2, 8, 16). Anlamlı bir histopatolojik inceleme için standardize morfometrik analiz gerekmektedir. Tanı amaçlı biyopsiler ideal olarak anorektal skuamo-kolumnar bileşkeden en az 1-1.5 cm uzaktan alınmalı, çapı en az 3 mm olmalı ve submukozanın en az üçte birini temsil etmelidir (2). Parafine gömülü dokularda, düzgün yönelimli/oryantasyonlu ve yeterli sayıdaki H&E boyalı kesitler ile genellikle submukozal ganglion hücrelerinin yokluğu net olarak belirlenebilir. Bu yöntem hem ucuzdur hem de HH tanısı verilebilmesi için genellikle yeterlidir (3, 8). Yayınlanan Uluslararası Çalışma Grubu Londra Klasifikasyonu yönergeleri, doku örneklerinin edinimi, kullanımı ve bulguların yorumlanmasındaki değişkenlikleri azaltmak için standart bir prosedür önermektedir (3, 5). Her biyopsi için 50 - 75 H&E boyalı parafin kesit incelenmesi gerektiğini bildirmektedir (2, 3). Yine Uluslararası Çalışma Grubu'nun nöromuskuler patolojinin değerlendirilmesi, raporlanması için hazırladığı standart bir prosedürde ganglion hücre sayımı ve birim alan-uzunluk başına düşen hücre sayısı temel alınmıştır (17). HH'nin tanısı ile ilgili olarak, deneyim

de şüphesiz, tanusal doğruluğu etkileyen en önemli değişkendir (8).

HH'de H&E boyalı kesitlerde submukozal aganglionosis yanısıra submukozal sinir hiperplazisi/hipertrofisi bulunur (16). HH' da çok sayıda hipertrofik (>40 µm çap) sinir lifinin varlığı pek çok olguda görülmekle olup, tanı koyulmasına yardımcı olur (8). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak hem submukozal hem de myenterik pleksus çapları aganglionik segmentte, hipoganglionik ve ganglionik segmente göre oldukça artmıştır. Submukozal ve myenterik pleksus çapları, ganglionik segmentten aganglionik segmente doğru artmış çapta izlenmiştir. Hem submukozal hem de myenterik pleksus çapları her üç zon için anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

HH'de nöronal pleksuslarda eozinofil lökositlerin varlığı bildirilmektedir (4, 18, 19). Eozinofil lökositler özellikle ganglion hücrelerinin yakınında diffüz ya da fokal olarak görülmektedir (4). Çalışmamızda da H&E boyalı kesitlerde her üç zonda submukozal ve myenterik pleksuslarda eozinofil lökositler dikkati çekmektedir. Yedi olgudan 6'sında myenterik pleksusda eozinofil lökositler izlenmiştir. Bu bulgunun HH tanısında destekleyici bulgu olabileceği literatürde de bildirilmektedir. HH 'de eozinofil lökositlerin görülmesinin nedeni net olarak bilinmemekte olup distansiyona sekonder de gelişebildiği düşünülmektedir. Klinik önemi ise halen araştırmaya açık bir konu olarak varlığını sürdürmektedir (4).

Genellikle yeterli, iyi oryante edilmiş, ezilmemiş, H&E boyalı biyopsi materyalinin dikkatli bir şekilde incelenmesiyle HH' nin kesin tanısı konulabilir (8). Biyopside hipoksi, forseps veya basınç ile mekanik hasar, gereksiz diatermi kullanımı, yetersiz fiksasyon gibi nedenlerle artefaktlar oluşabilir. Özellikle böyle durumlarda nöronal hücreler immunohistokimya kullanılarak daha doğru sayılabilmektedir (8, 17). H&E kesitlere ek olarak tanusal açıdan uygulanan histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemler HH tanısında patoloğlar için de yardımcı olabilmektedir (2, 8).

Kalretinin immunohistokimyasının rutin kullanımının HH için rektal biyopsilere yardımcı bir yaklaşım olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (8, 16, 20). Kalretinin, submukozal ve myenterik ganglion hücrelerinde görev yapan kalsiyum bağlayıcı proteindir (1, 8). Kalretinin normalde hem myenterik hem de submukozal pleksuslardaki ganglion hücrelerini boyamaktadır (21). HH 'de bu boyanma gözlenmemektedir (21). Guinard-Samuel ve ark. çalışmalarında, kalretinin immunohistokimyasının hem tanısal hem patolojiler arası uyum açısından avantaj sağladığını belirtmektedirler (12). Kannaiyan ve ark. kalretinin immunohistokimyasının ganglion hücreleri ve sinir fibrilleri için yüksek sensitif bir antikor olduğunu göstermişlerdir. Altmış HH olgusunu içeren çalışmalarında kalretinin immunohistokimyasının değerlendirmesinin kolay, yanlış yorumlama riskinin az ve HH şüphesinde tanıya oldukça yardımcı bir antikor olduğunu belirtmişlerdir (22). Kaçar ve ark. 10 HH'nin 11 cerrahi rezeksiyon ve 3 tam kat rektal biyopsi materyali ile kontrol grubunu (distal ve proksimal kolon örneklerini) karşılaştırarak kalretinin immunohistokimyasının yararlılığını araştırmışlardır (1). Çalışmalarında kalretinin immunohistokimyasının aganglionik dokularda çok duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğunu göstermişlerdir. Böylece tekrar biyopsi ve aşırı kesit ihtiyacının azaltılabileceği vurgulanmıştır (1). Çalışmamızda kalretinin immunohistokimyası ile lamina propria ve submukozada sinir fibrillerinin boyanma durumu incelenmiştir. Kalretinin immunohistokimyası ile ganglionik, hipoganglionik ve aganglionik zonlarda anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0.001$). Lamina propria ve submukozadaki sinir fibrillerinin ganglionik zonda; hipoganglionik ve negatif aganglionik zona göre yüksek oranda ve güçlü boyanma gösterdiği izlenmiştir.

Literatürde nöronal ve glial belirteçlerinde HH tanısında yardımcı yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (6, 20, 21). Bu belirteçlerden biri olan PGP 9.5 hipertrofik sinir fibrillerini boyamaktadır. S100' den farklı olarak sadece sinir lifleri ve glial hücrelerde ekspresyon alır (21). Jiang ve ark. çalışmasında ganglion hücresi bulunmayan olguların %91'inde PGP 9.5 boyası ile submukozal nöral hipertrofisi olduğu bildirilmektedir (21).

İmmunohistokimyasal boyanmada normal ve HH' den etkilenmiş doku oldukça farklıdır ve ayırt edilmesi, değerlendirmesi kolaydır. PGP 9.5 immunohistokimyası, özellikle izole hipoganglionozis durumunda, kalretinin immunohistokimyasına ek bir belirteç olabileceği ve bu tanısal protokolün duyarlılığını arttırabileceği bildirilmektedir (21). Çalışmamızda submukozal alanda sinir pleksusu başına düşen ortalama ganglion sayısı ve maksimum çapı PGP 9.5 immunohistokimyasal boyalı kesitlerle değerlendirilmiştir ve boyanma ganglionik ve hipoganglionik zonlarda anlamlı farklılık saptanmıştır. Çalışmamızda ganglionik zondaki submukozal ve myenterik pleksuslarda ortalama ganglion hücre çapı hipoganglionik kısımdaki pleksuslarda ortalama ganglion hücre çapından daha büyük olarak izlenmiştir ($p=0.002$, $p=0.002$). Yine ganglionik zondaki pleksuslarda ortalama ganglion hücre sayısı hipoganglionik kısımdaki pleksuslarda ortalama ganglion hücre sayısından daha fazla bulunmuştur ($p=0,003$, $p=0,002$).

Cajal hücrelerinin mekanik gastrointestinal aktivite ve regülasyonunda merkezi bir işlevi vardır. Cajal hücre kaybı gastrointestinal hareketlilik disfonksiyonu ile sonuçlanabilir (11). Çalışmaların çoğu, aganglionik bağırsakta ve HH' daki geçiş bölgesinde c-kit immunoreaktif Cajal hücre sayısının azaldığını göstermiştir (11, 20). Ancak incelenen tüm örneklerin daha önce uzun süren tıkanıklık hastalığına maruz kaldığı unutulmamalıdır. Bu nedenle Cajal hücrelerinin kaybının hastalık sürecinin sonucu veya sebebi olup olmadığını belirlemek zordur. Bazı çalışmalarda, HH 'de normoganglionik segmentte c-kit-pozitif hücrelerin anormal dağılımlarının kötü klinik sonuçları öngörmede kullanılabileceği de bildirilmektedir (11). Çalışmamızda Cajal hücre dansitesi c-kit immunohistokimyası ile değerlendirilmiştir. İncelemelerimizde aganglionik, hipoganglionik ve ganglionik kısımda bu açıdan istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,17$). Wedel ve ark. c-kit ve PGP 9.5 ekspresyonunun kombine immunohistokimyasal değerlendirmesinin daha uygun olduğunu bildirmektedirler (23).

Sonuç olarak, HH' de kolon aganglionik, hipoganglionik ve ganglionik alanlardan oluşmaktadır. Bu alanlar arasında anlamlı morfolojik farklılıklar

bulunmaktadır. Ganglion sayısının %40 dan fazla azaldığı bölgelerin geçiş zonu ya da hipoganglionik zon olarak kabul edilmiş olması literatür ile uyumluluk göstermektedir. Hipoganglionik bölgelerde hücre sayısı olduğu kadar hücre çapı da azalmaktadır. Bu bulgu morfometrik değerlendirmede göz önünde tutulmalıdır. Aganglionik segmentte submukozal ve myenterik plexus çapları anlamlı olarak fazladır, dolayısıyla hipertrofik plexus tanısı açısından değerli bir morfolojik bulgudur. Sinir plexus sayısı HH için anlamlı bir morfometrik bulgu değildir. HH'nin etyopatogenezinde Cajal hücrelerinin sayısal değişikliğine dair bir sonuç elde edilememiştir. Kalretinin immunohistokimyasal boyamasında kolinerjik sinir fibrillerinin aganglionik segmentte negatif olduğu gözlenmiştir.

HH'nin tanısında morfometrik değerlendirmenin önemi olduğundan, çalışmamız patoloğun deneyiminin önemini ortaya koymaktadır. Kalretinin immunohistokimyasal boyaması rutin olarak HH'nin tanısında kullanılabilir bir belirteçtir. "Hipoganglionozis gerçek bir antite midir?" sorusunun cevabı ise hala araştırılması gereken bir konudur.

TEŞEKKÜR

Yazarlar 2015.KB.SAG.045 başvuru numarası ile verilen BAP desteği dolayısıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kaçar A, Arıkök AT, Azılı MN, et al. Calretinin immunohistochemistry in Hirschsprung's disease: An adjunct to formalin-based diagnosis. *Turk J Gastroenterol* 2012; 23: 226-233.
2. Langer JC. Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr*. 2013; 25:368-374.
3. Schäppi MG, Staiano A, Milla PJ, et al. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57:677-686.
4. Kapur RP. Histology of the Transition Zone in Hirschsprung Disease. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:1637-1646.
5. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009; 118:271-301.
6. Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2013; 29:855-872.
7. Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2009; 18:212-223.
8. Kapur RP. Practical Pathology of Hirschsprung Disease. PNWSP 2011. <https://pnwsp.org/Fall2011/handouts/kapur.pdf> (20.06.2018)
9. Feichter S, Meier-Ruge WA, Bruder E. The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Semin Pediatr Surg* 2009; 18:206-211.
10. Piotrowska AP, Solari V, Puri P. Distribution of interstitial cells of Cajal in the internal anal sphincter of patients with internal anal sphincter achalasia and Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:1192-1195.
11. Gfroerer S, Rolle U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int* 2013; 29:889-897.
12. Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Mod Pathol* 2009; 22:1379-1384.
13. Moore SW. Total colonic aganglionosis and Hirschsprung's disease: a review. *Pediatr Surg Int* 2015; 31:1-9.
14. Kapur RP, Kennedy AJ. Transitional zone pull through: surgical pathology considerations. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21:291-301.
15. Best KE, Addor MC, Arriola L, et al. Hirschsprung's disease prevalence in Europe: a register based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014; 100:695-702.

16. Kapur RP. Calretinin-immunoreactive mucosal innervation in very short-segment Hirschsprung disease: a potentially misleading observation. *Pediatr Dev Pathol* 2014; 17:28-35.
17. Knowles CH, Veress B, Kapur RP, et al. Quantitation of cellular components of the enteric nervous system in the normal human gastrointestinal tract--report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23:115-124.
18. Lowichik A, Weinberg AG. Eosinophilic infiltration of the enteric neural plexuses in Hirschsprung's disease. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17:885-891
19. Umeda S, Kawahara H, Yoneda A, et al. Impact of cow's milk allergy on enterocolitis associated with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2013; 29:1159-1163.
20. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010; 59:882-887.
21. Jiang M, Li K, Li S, et al. Calretinin, S100 and protein gene product 9.5 immunostaining of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung' disease. *Am J Transl Res* 2016; 8:3159-3168.
22. Kannaiyan L, Madabhushi S, Malleboyina R, et al. Calretinin immunohistochemistry: a new cost-effective and easy method for diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 2013; 18:66-68.
23. Wedel T, Spiegler J, Soellner S, et al. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002; 123:1459-1467.

