Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره 51 فروردین و اردیبهشت سال 1385 (36- 30)

ارزش تشخیصی رنگ آمیزی انولاز اختصاصی نرون در بیوپسی‌های رکتوم بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونگ

ژیلا ترابی زاده (M.D.)*+ فرشاد نقش وار (M.D.)* امید عمادیان (M.D.)*
علیرضا علم(M.D.) ** علیرضا خلیلیان(Ph.D.)*** ناعمه پیوندی(M.D.)****

چکیده

سابقه و هدف: بیماری هیرشپرونگ (HD) شایع‌ترین علت انسداد روده‌ای نوزادان می باشد. به دلیل مشکلات وعوارض بیوپسی تمام ضخامت وعضلات سروزی رکتوم، تمایل به انجام بیوپسی مخاطی–زیرمخاطی رکتوم می‌باشد. ولی تفسیراین بیوپسی‌ها بارنگ آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین (H&E) و حتی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی(IHC) متداول یعنی استیل کولین استراز دارای مشکلاتی می باشد. از آنجا که اطلاعات درباره صحت رنگ آمیزی انولاز اختصاصی نرون (NSE) برای تشخیص هیرشپرونگ که مارکری دردسترس وقابل انجام برروی بلوک‌های پارافینه می‌باشد، ناکافی است، این مطالعه با هدف تعیین ارزش تشخیصی NSE بربیوپسی‌های مخاطی- زیرمخاطی رکتوم درتشخیص بیماری هیرشپرونگ واختلالات وابسته انجام شده ا ست.

مواد و روش‌ها : مطالعه بر65 بیوپسی مخاطی زیرمخاطی و65 بیوپسی عضلانی - سروزی (استاندارد) رکتوم بیماران مشکوک به بیماری هیرشپرونگ واختلالات وابسته مراجعه کننده به بیمارستان‌های بوعلی وشفای ساری (ازفروردین1382ـ مهر 1383) انجام شد. از هر بیمار یک بیوپسی مخاطی - زیرمخاطی و یک بیوپسی عضلانی– سروزی گرفته شد. لام‌های نمونه‌های مخاطی –زیرمخاطی با NSE ونمونه‌های عضلانیـ سروزی با H &E رنگ‌آمیزی و به‌صورت دوسوکورخوانده و با هم مقایسه شد. داده ها با فرمول‌های حساسیت و ویژگی موردتجزیه و تحلیل قرارگرفت.

یافته‌ها : حساسیت، اختصاصیت، کارائی وارزش اخباری مثبت ومنفی رنگ‌آمیزی NSE درتشخیص بیماری هیرشپرونگ به ترتیب 100درصد، 84/2 درصد، 89/1 درصد، 81/8 درصد، 100 درصد بود. که اختلاف معنی‌دار از نظر آماری با استاندارد نشان داد. دربررسی 5 مورد هیپوگانگلیوزیس، رنگ‌آمیزی NSE دریک مورد منفی کاذب ودر9 مورد مثبت کاذب وجود داشت.

استنتاج : یافتن سلول گانگلیونی با رنگ آمیزی NSE قطعا بیماری هیرشپرونگ را رد می‌کند وعدم وجود سلول‌های گانگلیونی در81/8درصد موارد تشخیص HD را به درستی مطرح می‌کند. لذا استفاده ازNSE در مواردی‌که نمونه یک بیوپسی مخاطی - زیرمخاطی باشد منطقی به نظرمی‌رسد. این روش شاید درنشان دادن وجود یاعدم وجود سلول گانگلیونی کافی باشد ولی شمارش سلول گانگلیونی (که در تشخیص اختلالات وابسته لازم است) نیازمند بررسی شبکه عصبی میانتریک است.

واژه‌های کلیدی : هیرشپرونگ، بیوپسی، رکتوم، انولاز اختصاصی نرون، ایمونو هیستوشیمی

E این تحقیق طی شماره 53- 81 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص پاتولوژی کلینیکال و سرجیکال، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران + * ساری : خیابان امیرمازندرانی - مرکز آموزشی درمانی امام
** فوق تخصص جراحی اطفال، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران *** دکترای آمار، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

**** دستیار پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
E تاریخ دریافت : 84/2/20 تاریخ تصویب: 84/5/26

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

مقدمه

بیماری هیرشپرونگ یک اختلال مادرزادی(1) و شایع‌ترین علت انسداد روده نوزادان می باشد(2). تشخیص استاندارد آن براساس اثبات آگانگلیوزیس دربیوپسی عضلانی – سروزی یا تمام ضخامت رکتوم می باشد و از اختلالات وابسته(هایپرگانگلیوزیس وهیپوگانگلیوزیس) باید افتراق داده شود(4و3و1).

پس از آن‌که اثبات شد که سگمان آگانگلیونیک در بیماران مبتلا به بیماری هیرشیرونگ در دو ناحیه مخاطی - زیر مخاطی و بین عضلانی دیواره روده طول یکسانی دارد، تمایل زیادی به ارسال بیوپسی رکتال به‌صورت مخاطی – زیر مخاطی ایجاد شد. زیرا که برداشتن بیوپسی عضلانی نیاز به بیهوشی عمومی داشته، از نظر تکنیک جراحی مشکل بوده و عوارض خطرناکی مانند پرفوراسیون، اسکار ، تنگی و خون‌ریزی دارد.در حالی‌که بیوپسی مخاطی – زیر مخاطی را می توان با روش ساکشن رکتال بیوپسی به‌صورت سرپایی در مطب بدون عارضه قابل توجهی انجام داد(1،3،5). اما تفسیر یک بیوپسی مخاطی ـ زیرمخاطی بسیار دشوارتر از بیوپسی عضلانی ـ سروزی است. شبکه زیرمخاطی و سلول‌های گانگلیونی آن کوچک‌تر و با انتشار نامنظم تر از شبکه میانتریک می باشند. سلول‌های گانگلیونی در رنگ آمیزی روتین H&E قابل اشتباه با سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست، هیستیوسیت ولنفوسیت می باشند (3) رنگ آمیزی استیل کولین استراز اولین مارکر IHC به‌کار رفته بربیوپسی مخاطی ـ زیرمخاطی رکتال)(6) دارای مشکلاتی است ازجمله آنکه تنها قابل انجام برمقاطع تازه می باشد(نمونه تازه همیشه در دسترس نیست) وبا خون‌ریزی زیرمخاطی تفسیرآن مشکل می شود(5) ونیزدارای موارد منفی کاذب ومثبت کاذب است(8و7و3)علی‌رغم بررسی‌های وسیع برمارکرهای ایمونوهیستوشیمی هنوز هم پاتولوژیست‌ها برسریک مارکرتوافق ندارند(13-9). گرچه NSE مورد توجه می‌باشد ولی نتایج تحقیقات درمورد آن ناکافی وتا حدی متناقض است وگزارش دقیقی ازحساسیت واختصاصیت آن دردست نیست.

نتایج مطالعه Lampert,HALL (14)، Vinore-SA و همکاران (13)، Frykberg و همکاران (15) و Machenzie وهمکاران (16) اشاره به مفید بودن NSE در تشخیص بیمار هیرشپرونگ‌کرده است ولی گزارشی از ارزش تشخیصی آن نداده است. در مطالعه Ana Margarida وهمکاران(17) نیز روش NSE مزیت قابل توجهی بر H&Eدر زیرمخاط نداشته است. نتایج بررسی طالبی وهمکاران با مطالعه بر بیوپسی رکتوم ارزش‌تشخیصی، را به ترتیب ازکاتپسین D، NSE,CD56 نشان داده است(12).

با توجه به ارزان، در دسترس و آسان بودن تکنیک، قابل انجام بودن بر بلوک‌های پارافینه و نشان دادن سلول گانگلیونی علاوه بر الیاف عصبی در رنگ‌آمیزی NSE طرف و عدم وجود اطلاعات کافی از ارزش تشخیصی، ارزش تشخیصی رنگ آمیزی NSE بر روی نمونه‌های بیماران مشکوک به هیرشیرونگ در بیمارستان‌های بوعلی سینا و شفا ساری بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت آینده‌نگر روی نمونه‌های بیوپسی رکتال مخاطی- زیرمخاطی 67 بیمار مشکوک به بیماری هیرشپرونگ و اختلالات وابسته (از فروردین 82 تا مهر 83) که به بیمارستان‌های بوعلی و شفای ساری مراجعه کرده بودند انجام گرفت. در همه بیماران مشکوک به هیرشیرونگ، توسط پزشک فوق تخصص جراحی اطفال 2 نمونه بیوپسی (یکی مخاطی زیرمخاطی

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

و دیگری تمام ضخامت یا عضلانی ـ سروزی) از 2cm یا بیشتر بالای anal valve برداشته شد. کلیه نمونه‌ها در محلول فرمالین 10درصد گذاشته شد و به مدت 12-18 ساعت فیکس شده و بعد از طی مراحل لازم، بلوک‌های پارافینی تهیه شد. سپس از نمونه‌ها مقاطع 4 تهیه شده و 5 تا 10 مقطع از بیوپسی عضلانی با روش H&E و دو مقطع از هر نمونه مخاطی ـ زیرمخاطی با روش NSE (Poly clonal Rabbit Anti-NSE) (طبق دستور کارخانه سازنده DAKO) رنگ‌آمیزی گردید. اسلایدها به صورت دوسوکور از نظر وجود یا عدم وجود سلول گانگلیونی و در صورت وجود سلول گانگلیونی از نظر تعداد بررسی و نتایج نمونه های مخاطی زیر مخاطی با نمونه های عضلانی (استاندارد) مقایسه شد. و در پایان با فرمول‌های حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و منفی و کارایی، محاسبات لازم انجام شد و با فرمول MCNemal و جدول Pvalue X محاسبه گردید.

کرایتریای تشخیص هیستوپاتولوژیک :

- بیماری هیرشپرونگ : فقدان سلول گانگلیونی در شبکه عصبی (1)

- هیپوگانگلیوزیس: حضور اندک(2-1) سلول گانگلیونی در هر شبکه عصبی یا گانگلیای اینترامورال (10.17).

- دیسپلازی عصبی روده (IND): وجود گانگلیای عصبی هایپرتروفیک حاوی تعداد نرمال(5-3) یا افزایش یافته سلول گانگلیونی بزرگ (پریکاریون بزرگ با هسته بیزار) ،گاهاً وجود سلول گانگلیونی به صورت ایزوله در ناحیه زیرمخاط (1.17.19).

یافته‌ها

از 67 نمونه ارسالی 2 مورد به دلیل ناکافی بودن ناحیه زیرمخاطی حذف شد. از 65 نمونه، 47 مذکر و 18 مونث با دامنه سنی یک‌روز تا 10 سال،میانگین سنی 1/7 سال، میانه سنی 60 روز بود.

علت مراجعه63بیمار، یبوست و 2بیمار مقعد سوراخ نشده داشتند.

بررسی میکروسکوپی 65 مورد بیوپسی عضلانی- سروزی رکتوم که با روش H × E رنگ آمیزی شده بود (استاندارد طلایی) نشان داد که، 27 مورد سلول گانگلیونی نداشته و 38 مورد سلول گانگلیونی داشتند از 38 مورد، 33 مورد نرمال و 5 مورد هیپوگانگلیوزیس و در هیچ مورد هایپرگانگلیوزیسی وجود نداشت.

بررسی میکروسکوپی بیوپسی‌های مخاطی- زیر مخاطی رکتوم بیماران که با روش NSE رنگ آمیزی شده بود نشان داد که، 33 مورد سلول گانگلیونی نداشته و 32 مورد سلول گانگلیونی داشتند. در مقایسه مورد به مورد با استاندارد، مثبت کاذب 6 مورد و هیچ منفی کاذبی وجود نداشت.

جدول شماره 1 نتایج ارزش تشخیصی NSE در بیوپسی‌های مخاطی- زیر مخاطی رکتوم در را نشان می‌دهد.

جدول شماره 1 : نتایج ارزش تشخیصی NSE در بیوپسی‌های مخاطی- زیر مخاطی رکتوم بیماران مشکوک به هیرشیرونگ

ویژگی	%84/2
حساسیت	%100
ارزش اخباری مثبت(PPV)	%81/8
ارزش اخباری منفی (PPV)	%100
کارایی	%89/1
Pvalue	<0/05

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

نتایج نشان داد که تفاوت این تست با استاندارد از نظر آماری معنی‌دار بوده و قدرت تشخیص دوروش تفاوت دارد.

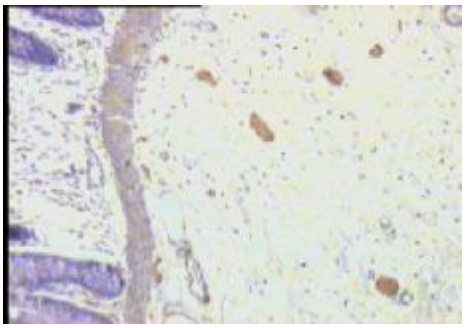
بررسی‌میکروسکوپی‌نمونه‌های دارای سلول گانگلیونی از نظر تعداد سلول گانگلیونی با رنگ‌آمیزی NSE نشان داد که 19 مورد نرمال و 13 مورد هیپوگانگلیوزیس بود. 33 نمونه که در روش استاندارد، نرمال گزارش شده بود، ربیوپسی‌های مخاطی- زیرمخاطی و با روشNSE ، 19 مورد نرمال ، 9 مورد هیپوگانگلیوزیس، 5 مورد هیرشیرونگ تشخیص داده شد.

5 مورد که در روش استاندارد، هیپوگانگلیوزیس گزارش شد، در بیوپسی های مخاطی- زیرمخاطی و با روش NSE ، 4 مورد هیپوگانگلیوزیس و 11 مورد هیرشیرونگ تشخیص داده شد.

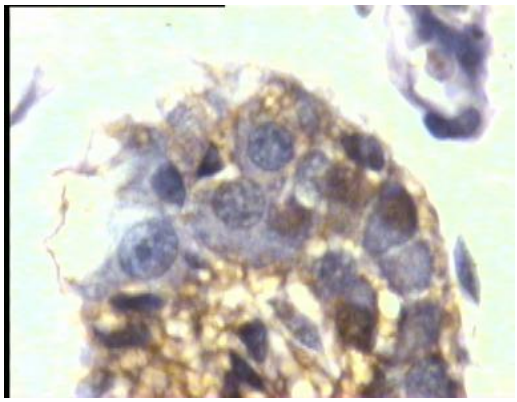
بحث

تاکنون تنها چند مارکر IHC جهت مشخص کردن سلول‌های گانگلیونی گزارش شده است(18و1) و NSE از جمله این مارکرها می باشد. (جهت رد HD، مشاهده GC ضروری می‌باشد تا تشخیصی بر اساس تعریف بیماری ارائه شود.).

در بررسی بیوپسی‌های مخاطی ـ زیرمخاطی با NSE، شبکه عصبی به رنگ قهوه‌ای در یک زمینه بی‌رنگ دیده می‌شود و یافتن آن حتی در درشت نمایی پایین به راحتی امکان‌پذیر است و لذا یافتن سلول‌های گانگلیونی تسهیل می‌شود. سیتوپلاسم سلول‌های گانگلیونی قهوه‌ای شده و هسته سلول شوان رنگ نمی‌گیرد.(شکل شماره 1و2) ممکن است سلول‌های التهابی راکسیون ضعیفی نشان دهند ولی توجه به موقعیت سلول گانگلیونی در شبکه عصبی و آشنایی و توجه به سیتولوژی آن سبب می گردد که این سلول‌ها با هیچ سلول دیگری اشتباه نشوند. در این مطالعه نیز در بررسی 27 مورد مبتلا به بیماری هیرشپرونگ هیچ منفی کاذبی نداشته و حساسیت این مارکر در تشخیص بیماری هیرشپرونگ 100درصد بود.



شکل شماره 1: بیوپسی مخاطی- زیر مخاطی رکتوم نرمال از شیرخوار 37 روزه- شبکه‌های عصبی مایسنر متعدد برنگ قهوه‌ای با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی NSE به‌خوبی دیده می‌شوند. بزرگ نمایی



www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

شکل شماره 2: بیوپسی ذکر شده در شکل 1 ـ یک شبکه عصبی مایسنر با سلول‌های گانگلیونی متعدد در بزرگنمایی بیش‌تر دیده می شود.سلول‌های گانگلیونی واکنش سیتوپلاسمی مثبت با رنگ آمیزی NSE نشان می دهند. 1000×

در مطالعه Anna.Athow و همکاران در لندن (1987 تا 1980) بر روی 60 بیمار مشکوک به هیرشپرونگ و بر بیوپسی‌های مخاطی ـ زیرمخاطی با استیل کولین استراز، منفی کاذب 44درصد و مثبت کاذب 2 مورد گزارش شد(7). 44درصد منفی کاذب در مقایسه با نداشتن منفی کاذب در روش NSE پایه‌های تشخیصی را در استفاده از استیل کولین استراز تا حدی سست می کند.

در این مطالعه 6 نمونه مثبت کاذب گزارش شد که می تواند ناشی از توزیع هتروژنوس NSE در سلول‌های گانگلیونی و به‌خصوص سلول‌های گانگلیونی نابالغ باشد. تجزیه و تحلیل آماری نشان‌گر اختلاف آماری معنی دار این تست با استاندارد بود. بنابراین ارزش اخباری منفی معادل 100درصد بسیار ارزشمند است و بایک بیوپسی کم عارضه مخاطی‌ـزیر مخاطی رکتوم قطعا می توان HD را کنار گذاشت.

نتایج بررسی HALL وهمکاران در آمریکا (1985) برروی 27 نمونه بیوپسی رکتال زیرمخاطی کودکان مشکوک به بیماری هیرشپرونگ با استفاده از NSE و S 100 نشان داد، این تکنیک ها شناسایی اشکال نابالغ وکوچک سلول گانگلیونی را تسهیل می کند(14) ولی جهت تعمیم این نتایج به نظرمی رسد لازم باشد مطالعه برتعداد بیش‌تری نمونه انجام گیرد.

نتایج sternberg (2004) نیز نشان داد که درانجام تست های ایمونوهیستوشیمی NSE برمقاطع بافتی موفق بودند(19) هم‌چنین بررسی طالبی وهمکاران دراصفهان (1383) بر 47 نمونه بیوپسی رکتوم و 10 مارکر مختلف برهرنمونه نشان دادکه ارزش تشخیصی هرمارکربراساس کیفیت رنگ آمیزی وقدرت تمایزآنها به ترتیب مربوط به کاتپسین D و CD56 و NSE می‌باشد.(12).

در این مطالعه نتایج بررسی موارد نرمال و هیپوگانگلیوزیس (موارد دارای سلول گانگلیونی) در بیوپسی‌های مخاطی- زیر مخاطی رنگ‌آمیزی شده با NSE با یافته های استاندارد مطابقت نداشت. به نظر می‌رسد علت این عدم تطابق تعداد کمتر سلول‌های گانگلیونی در ناحیه زیر مخاطی در مقایسه با ناحیه بین عضلانی باشد. لذا تشخیص موارد نرمال و هیپوگانگلیوزیس در بیوپسی های مخاطی – زیر مخاطی با استفاده از کرایتریاهای مورد استفاده در ناحیه بین عضلانی دچار اشکال می‌شود. این مشکل نه تنها در صورت استفاده از NSE، بلکه در صورت استفاده از هر مارکری که سلول گانگلیونی را نشان می دهد بروز می‌کند این درحالی است که در منابع موجود، کرایتریای مجزایی جهت تشخیص این موارد درزیرمخاط وجود ندارد ونیز Ana Margarida(17) با همین کرایتریای تشخیصی، اقدام به تشخیص نمودند. شاید لازم باشد جهت رفع این مشکلات با تحقیق بیش‌تر کرایتریای جدیدی در ناحیه زیرمخاط جهت تشخیص موارد نرمال واختلالات‌وابسته ارائه شود.

دراین مطالعه ازمجموع 5 مورد هیپوگانگلیوزیس 4 مورد به درستی با NSE تشخیص داده شد. البته به‌دلیل تعداد کم این موارد، نمی توان نتایج را قاطعانه به نمونه‌های، بیش‌تر تعمیم داد. هم‌چنین در این مطالعه هیچ مورد هایپرگانگلیوزیس وجود نداشت اصولا کرایتریاهای تشخیصی و حتی وجود آن مورد بحث است و بساری معتقدند که این تشخیص را باید برای موارد با پاتولوژی چشمگیر گذاشت(19).

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Vinore-SA وهمکاران (1985) با استفاده ازNSE بربیوپسی رکتال زیرمخاطی ونیز نمونه های جراحی نتیجه گرفتند NSE تشخیص موارد هیپوگانگلیونیک را ازآگانگلیونیک تسهیل می کند(13) به‌نظر می‌رسد جهت تعمیم نتیجه گیری لازم است کلیه نمونه های انتخابی بیوپسی مخاطی= زیرمخاطی باشد.

نتایج نشان می‌دهد یافتن سلول گانگلیونی در روش NSE قطعا تشخیص هیرشپرونگ را رد می کند و عدم وجود سلول گانگلیونی در 81/8 درصد موارد تشخیص را به درستی مطرح می کند، لذا استفاده از NSE در مواردی‌که نمونه در دسترس جهت تفسیر یک بیوپسی مخاطی- زیرمخاطی رکتال می‌باشد جهت رد بیماری هیرشپرونگ منطقی به‌نظر می‌رسد. NSE با حساسیت بالا درکنار یک مارکر با اختصاصیت بالاتر (درآینده) می‌تواند به‌صورت پانل تشخیصی به‌کار رود. به نظر می‌رسد وجود این مارکر در زیر مخاط، جهت نشان دادن وجود یا عدم وجود سلول گانگلیونی کافی باشد ولی شمارش سلول گانگلیونی کافی نیازمند شبکه عصبی میانتریک است.

سپاسگزاری

از زحمات آقای دکتر شهریار شفائی، متخصص کلینیکال و آناتومیکال پاتولوژی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل که در امر رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی همکاری داشته اند قدردانی می شود.

فهرست منابع

1. Rosi. Juan. ***Ackerman s,surgical Pathology,*** 9th Edition,USA: mosby – Year book Inc. 2004,777-779
2. Behrman E. Richard, kliegman M. Robert, Jenson B. Hal, ***Nelson test book of pediatrics***,16th Edition .u.k: wB. Saunders, 2000,1139-1141
3. Stocker J. Thomas, Dehner louis P. ***Pediatric pathology***, Lippincott Williams and wilkins, second Edition ,2001,649-653.
4. Hyams,wyllie, Pediatric Gastro intestinal ***Disease,second Edition***, WB/ saunders, 1999,489-498.
5. O Neill james A., Rowe MarcI , Grosfeld Jayl, ***Pediatric surgery***, Fifth Edition, 1999, 1390-1396.
6. Meier Ruge w, lutter beck PM, Herzog B, Morger R, Moset R, Scharli AF. Acetylcholin esterase activity in suction biopsy of rectum in the diagnosis of Hirschsprung s disease, ***J Pediatric surg***, 1972; 7:11-17.
7. Athow AC, filipe MI, Drake DP. Problems and advantages of acetylcholin esterase histochemistryof rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung s disease ,***J-pediatr –surg*** 1999 May; 25(5): 220-9.
8. Novak N, Peiffer J, Acetyl cholinesterase negativity in the lamina propria in the First 8 weeks of life dose not exclude ***Hirschsprung s diseas, z-kinderchir***, 1989 Feb; 44(1): 33-6.

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

9. Koteeswaran Rajasekaran, Gop Alan Rama, Hirschsprung s Disease Immunohistochemical markers using s_{100} and cathepsin D as a potential aid to diagnosis, 2002; 23: 11:1-16.
10. Miyasaki E, Ohshiro K, Puri P, NADPH – diaphorase histochemical staining of suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung s disease and allied disorders, ***pediatr-surg*** – INT, 1998 sep; 13(4): 464-7.
11. Petchasuwan C, Pintong J, Immunohistochemistry for intestinal ganglion cells and nerve fibers, aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease, ***J-Med, Assoc –Thai***, , 2000 Nov; 83(11): 1402-9.
12. طالبی. اردشیر، عدالتی. مسعود، معمارزاده. مهرداد، وحیدی. نسرین، ***انتخاب بهترین پانل تشخیصی از مارکرهای ایمونو هیستوشیمی برای تعیین سلول گانگلیونی در بیماری*** هیرشپرونگ، همایش آسیب شناسی ایران، تهران، 1383.
13. Vinores SA, May E, Neuron specific enolase as an immuno histochemical tool for the diagnosis of Hirschsprung s disease , ***AM – J surg*** –Pathol 1985 Apr; 9(4): 281-5.
14. Hall CH, Lampert PW, Immunohistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease ,J Neuropathol- ***EXP Neurol***, 1984; 43: 311.
15. Frykberg T, Esscher T, Pahlman S, Olsson Y, Neuron- specific enolase as a marker for intestinal neurons.An immunocyto chemical study of the human intestinal tract, ***Acta- Neuropathol, Berl***, ,1985; 66(3): 184-7.
16. Mackenzie JM, Dixon MF. An immunohistochemical study of the enteric neural plexi in Hirschsprung s disease, ***Histopathology***, 1987; 11(10): 1055-66.
17. Ana-Margarida,Barbosa- AJ,Carvalho-AA,pinheiro-FC, Coelho-M,cabral- MM, usefulness of immuno cyto chemical demonstration of neuron-specific enolase in the diagnosis of Hirschsprung s diseases, ***J-Pediatr- Gastro enterol-Nutr,*** Nov 1990; 11(4): 496-502.
18. Matthias J. szabolcs. M.D, James visser, JD, Michael shelanski M.D,Peripherin a novel marker for the immunohistochemical study of-malformation of enteric nerveus system. pediatric pa***thology and labratory medicine*** 16,1996,51-70.
19. Christopher L,. HALL, M.D, PETER W. Lampert MD, Immunuhistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung s disease. ***Am-J, clin pathol***, feb 1985; 83(2): 177-81.
20. Sternberg Stephans, Antonioli Donald A., cater Darryl, Mills Stacey E. aberman Harold A., ***Diagnostic surgical pathology, 4th Edition ,Lippincott Williams and wilkins***, 2004,139.

www.SID.ir
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com