

Konventionelle histologische Diagnostik in der Koloproktologie

Die pathologische Aufarbeitung und histopathologische Untersuchungstechnik bei gastrointestinalem Motilitätsstörungen folgt einem Algorithmus, welcher das Alter des Patienten und den Typ der zu erwartenden Motilitätsstörung einbezieht.

Bei Kindern im Neugeborenenalter steht die Abklärung mit Verdacht auf einen M. Hirschsprung im Vordergrund. Bei Erwachsenen mit „slow transit constipation“ werden die interstitiellen Cajal-Zellen untersucht, und beim idiopathischen Megakolon des Erwachsenen ist das kollagenfaserige Bewegungsgerüst der Muscularis propria darzustellen. Jede dieser Indikationen erfordert eine adäquate Gewebeentnahme und Gewebebehandlung für eine schlüssige Diagnostik.

Während die diagnostische Siriusrot-Färbung zur Analyse von kollagenfaserigem Bindegewebe bei routinemässiger Paraffineinbettung nach Formalinfixation gut funktioniert, sind Hämatoxylin-Eosin-Färbungen oder immunhistochemische Reaktionen an Kolonschleimhautbiopsien bei der Diagnostik der Aganglionose des Kolons (M. Hirschsprung) wenig aussagefähig. Hier erlaubt die Enzymhistochemie hingegen eine klare Diagnose.

Zur Untersuchung des enteralen Nervensystems im Hinblick auf die Frage einer Hypoganglionose kann an einem formalinfixierten Resektat nach Durchführung immunhistochemischer Reaktionen Stellung genommen werden.

Die Immunhistochemie stellt ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel dar, wenn im Rahmen konsiliarischer Beurteilung lediglich formalinfixierte und paraffineinbettete Gewebeproben vorliegen [1].

Im Folgenden werden die routinemässig anwendbaren Färbungen genannt und in Ihrer Bedeutung vergleichend beschrieben und diskutiert.

Immunhistochemische Darstellung von Nervenzellen an Paraffinschnitten

Im Laufe der vergangenen Jahre haben sich bei Paraffinschnitten folgende Färbungen und immunhistochemische Reaktionen bewährt:

- Immunhistochemie für S100,
- Immunhistochemie für Cathepsin D,
- konventionelle Färbung Pikrosiriusrot.

Die immunhistochemische S100-Reaktion erlaubt an Schleimhautbiopsien nur eine sehr begrenzte Aussage. Für eine zuverlässige Diagnose eines M. Hirschsprung ist die immunhistochemische S100-Reaktion nicht geeignet [2]. An Ganzwandbiopsien lassen sich mit dieser Reaktion aber sehr gut Gangliengröße und Ganglienabstände beurteilen (► Abb. 1 a). Bezüglich der Nervenzellzahl und -größe des Plexus myentericus ist die Cathepsin-D-Reaktion eine zuverlässige Methode (► Abb. 1 b). Durch Osmierung lässt sich eine kontrastreiche Nervenzelldarstellung erzielen, die auch eine zuverlässige Beurteilung des Plexus submucosus erlaubt (► Abb. 1 c). Ein wichtiger Vorteil der Cathepsin-D-Reaktion ist die sehr kurze Hitzedenaturierung der Schnitte [3, 4].

Alternative immunhistochemische Reaktionen zur Nervenzelldarstellung an Paraffinschnitten sind:

- PGP 9,5,
- neuronenspezifische Enolase.

All diese Nervenzellfärbeverfahren der Immunhistochemie sind mit Vorteil an Paraffinschnitten anwendbar. Zusätzlich kommt die immunhistochemische Darstellung der Cajal-Zellen in der CD117-Reaktion zur Anwendung.

Bei der „Slow-transit-Obstipation“ wurde parallel zur Entwicklung einer atrophen Hypoganglionose auch eine Abnahme der Cajal-Zellen beobachtet [6, 7]. Trotz der zahlreichen Arbeiten über Cajal-Zell-Veränderungen ist bei motorischen Störungen des Kolons bis heute kein Krankheitsbild beschrieben worden, welches sich ausschließlich aufgrund von Cajal-Zell-Veränderungen diagnostizieren ließe [5].

Enzymhistochemie vs. konventionelle Paraffinteknik

Rudolf Virchow [14, 15] benannte als Ziel jeglicher Forschung in der Pathologie die Erkennung der Pathophysiologie einer Krankheit. Jede histologische Methode lässt eine Aussage zu, die je nach eingesetzter Technik einen unterschiedlichen Aussagewert zulässt:

- Die Paraffinteknik erlaubt den Nachweis pathologischer Strukturveränderungen und wurde zum Wegbereiter der Zellularpathologie.
- Die Immunhistochemie arbeitet analog zu histologischen Färbungen an formalinfixiertem Gewebe mit Paraffinschnitten und weist proteinchemische Veränderungen eines Gewe-

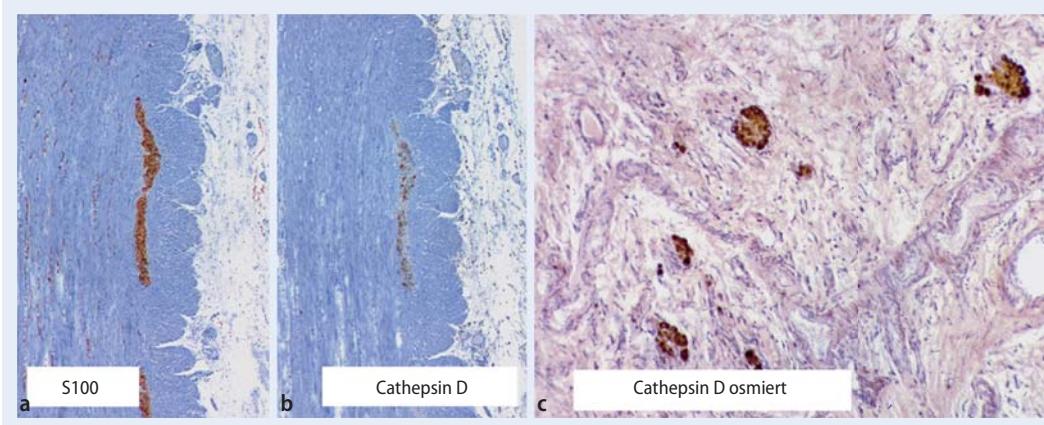


Abb. 1 ▲ Darstellung des Plexus myentericus. **a** Die S100-Reaktion eignet sich nur zur Bestimmung der Länge der Anschnitte des Plexus myentericus und zur Abschätzung der interganglionären Abstände. **b** Die Cathepsin-D-Reaktion ermöglicht eine optimale Nervenzelldarstellung. **c** Die osmierte Cathepsin-D-Reaktion erlaubt in der Submukosa eine optimale Ganglien- und Nervenzelldarstellung

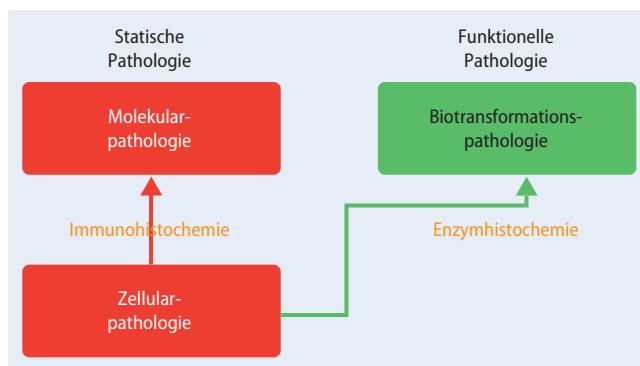


Abb. 2 ▲ Gegenüberstellung der traditionellen statischen Pathologie an formalinfixierten Paraffinschnitten und der funktionellen Pathologie an nativen Kryostatschnitten mit einer histopathischen, enzymhistochemischen Darstellung der verschiedenen Enzyme

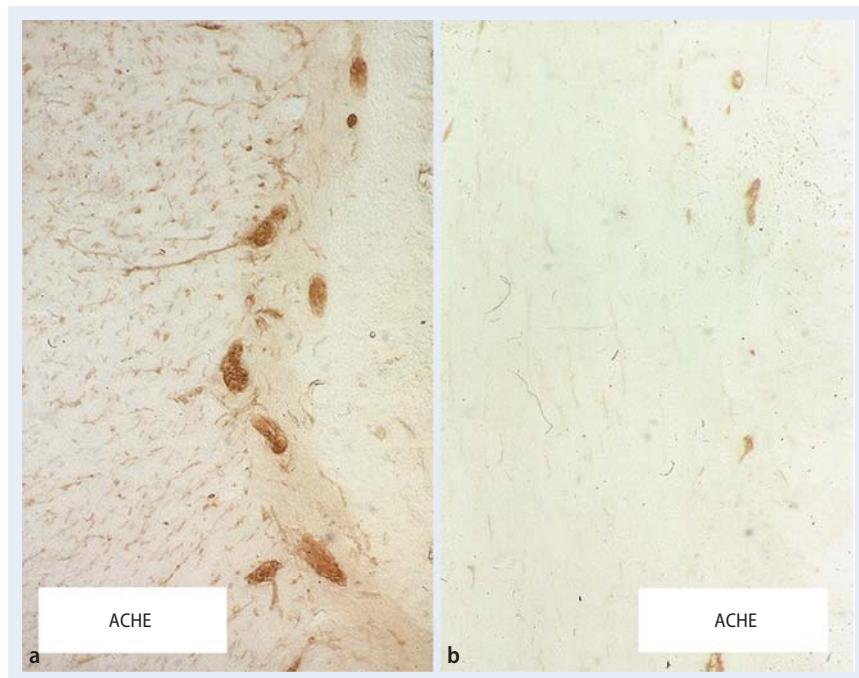


Abb. 3 ▲ **a, b** Verlaufsbeobachtung einer progressiven, atrophenischen oligoneuronalen Dysganglionose des Plexus myentericus. Unschwer erkennbar ist die in 6 Jahren eingetretene Atrophie der Ganglien des Plexus myentericus und die massive Abnahme der Acetylcholinesterase-Aktivität in Ring- und Längsmuskulatur (Acetylcholinesterase-Reaktion ohne Gegenfärbung)

bes nach [1]. Die Immunhistochemie hat in der Diagnostik der Tumorphäthologie große Fortschritte gebracht.

— Die enzymhistochemische Nativschnitttechnik ermöglicht Stoffwechselveränderungen besonderer Gewe-

bekompartimente zu erfassen. Mit dieser Technik sind Krankheitsverläufe zu verfolgen, die Vitalität eines Gewebes zu beurteilen und Einsichten in die Pathophysiologie einer Krankheit zu gewinnen (■ Abb. 2; [8, 9, 10, 11, 12]).

In der Tat ist die Enzymhistochemie die erste Methode, welche der Forderung Virchows nach einer Erfassung der Pathophysiologie einer Krankheit nachkommt [8, 9, 10]. Ihr besonderer Vorteil ist die Vermeidung von Fixierungs- und Einbettungsartefakten. Darüber hinaus ist bei der Darstellung von Dehydrogenasen, Phosphatasen und Esterasen das Ergebnis innerhalb von 5–10 min ablesbar.

Durch günstige Gewebeanordnung können am Gefrierschnitt auf einfache Art und Weise große Gewebeareale untersucht werden. So ist es beispielsweise möglich (s. dazu den Beitrag zu enzymhistochemischen Färbetechnik in dieser Ausgabe von *Der Pathologe*), einen 10–15 cm langen Darmabschnitt aufgerollt zu schneiden und so in einem einzigen Schnitt eine Übersicht über ein Gesamtresektat zu gewinnen [11, 12]. Nicht zuletzt erlaubt die Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit der Enzymhistochemie eine optimale intraoperative Schnellschnittdiagnostik.

Im Vergleich zur Paraffintechnik am formalinfixierten Gewebe besitzt die Enzymhistochemie allerdings einige Nachteile: Es muss mit nativem Gewebe gearbeitet werden. Nichtfixiertes Gewebe ist mit 1–6 Stunden nur begrenzt haltbar, was aber durch Gefrieren des Gewebes in CO_2 (-80°C) überwindbar ist. Gewöhnungsbedürftig ist bei dieser Technik die Schnittdicke der Kryostatschnitte ($15\text{ }\mu\text{m}$),

Zusammenfassung · Abstract

da diese durch Aufziehen, Auftauen und Trocknen der Schnitte auf Objekträgern 70% ihres Volumens verlieren [13].

Schlussfolgerung

Die konventionelle histologische Technik ist in der Koloproktologie im Allgemeinen und in der Hirschsprung-Diagnostik im Besonderen nicht befriedigend. Da es sich bei Störungen der Darmmotorik um funktionelle Anomalien handelt, ist eine die Pathophysiologie erfassende Methode bedeutend effektiver. Nervenzellverluste, Atrophien von Ganglien oder eine Atrophie des Sehnengerüstes der *Muscularis propria* (Desmose) sind mit immunhistochemischen und konventionell histologischen Techniken durchaus an Paraffinmaterial befriedigend erfassbar.

Über den Parasympathikotonus oder die Vitalität von Nervenzellen des *Plexus myentericus* bzw. der Vitalität der *Muscularis propria* lässt sich mit der konventionellen Histologie allerdings keine Aussage erzielen (Abb. 3 a,b). Wir verfügen über keine immunhistochemische Methode, die der enzymhistochemischen Acetylcholinesterase-Darstellung ebenbürtig wäre [2]. Somit besteht keine Möglichkeit, einen ultrakurzen M. Hirschsprung (Abb. 4 a,b) bzw. eine auf den Analring, den M. corrugator cutis ani (Abb. 5 a,b) oder den Sphincter internus beschränkte Aganglionose mit einer konventionellen histologischen Methode zu diagnostizieren.

Fazit für die Praxis

Am Paraffinschnitt der *Muscularis propria* ist mit einer immunhistochemischen S100-Reaktion, einer immunhistochemischen Cathepsin-D-Reaktion und der Pikro-Siriusrot-Färbung eine oligoneuronale Hypoganglionose, eine atrophische Hypoganglionose und eine Desmose der *Muscularis propria* eindeutig zu diagnostizieren. Eine Schleimhautbiopsie mit reichlich biopsierter Submukosa erlaubt in einer osmierten Cathepsin-D-Reaktion eine intestinale neuronale Dysplasie (IND) Typ B zu erkennen.

Eine zuverlässige Hirschsprung-Diagnose an Schleimhautbiopsien kann auf eine enzymhistochemische Acetylcholin-

Pathologe 2007 · 28:101–104 DOI 10.1007/s00292-007-0895-9
© Springer Medizin Verlag 2007

W. A. Meier-Ruge · E. Bruder

Konventionelle histologische Diagnostik in der Koloproktologie

Zusammenfassung

Die histologische Diagnostik mit formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe hat mit der Einführung immunhistochemischer Methoden in der Koloproktologie große Fortschritte gebracht. In den letzten Jahren haben sich die routinemäßige Durchführung einer S100-Reaktion, einer Cathepsin-D-Reaktion und einer Pikro-Siriusrot-Färbung für die Diagnose einer Hypoganglionose des *Plexus myentericus* sowie einer Desmose der *Muscularis propria* bewährt. In speziellen Fällen ist für die Darstellung von Cajal-Zellen eine CD117-Reaktion erforderlich. Im Gegensatz dazu ist beim ultrakurzen M. Hirschsprung, einer Aganglionose des Analrings, des M. corrugator cutis ani oder des Sphincter internus die diagnostisch entscheidende Acetylcholinesterase-Reaktion

durch keine immunhistochemische Methode ersetzbar.

Immunhistochemie, klassische histologische Färbungen und Enzymhistochemie stellen somit komplementäre histopathologische Untersuchungstechniken dar. Im Gegensatz zur Immunhistochemie bedarf die Enzymhistochemie nativer Kryostatschnitte zur Beurteilung der Aktivität eines Enzyms. Biopsieentnahme und Transport zur beurteilenden Pathologie müssen daher besonders gut organisiert sein.

Schlüsselwörter

Konventionelle Histologie · Immunhistochemie · Enzymhistochemie · Motilitätsstörungen

Conventional histological diagnostics in coloproctology

Abstract

With the introduction of immunohistochemical methods, histopathological diagnosis based on formalin fixed, paraffin embedded tissue in coloproctology has substantially improved. In recent years, the routine use of immunohistochemistry for S100, cathepsin D and a picrosirius red staining has proven to be sufficient for the diagnosis of hypoganglionosis of the myenteric plexus and desmosis of the muscularis propria. In some cases, an immunohistochemical reaction for CD 117 is also necessary for the evaluation of Cajal cells. In contrast, in ultrashort Hirschsprung's disease, aganglionosis of the anal ring, aganglionosis of the *musculus corrugator cutis ani*, and internal sphincter, the histochemical acetylcholinesterase reaction is essential and

not replaceable by any immunohistochemical method.

Immunhistochemistry, classical histological stains and enzyme histochemistry are complementary histopathological techniques. In contrast to immunohistochemistry, enzyme histochemistry requires native cryostat sections for the assessment of enzyme activity. As a consequence, biopsy performance and transport to pathology departments should be particularly well organized.

Keywords

Conventional histology · Immunohistochemistry · Enzyme histochemistry · Motility disorders

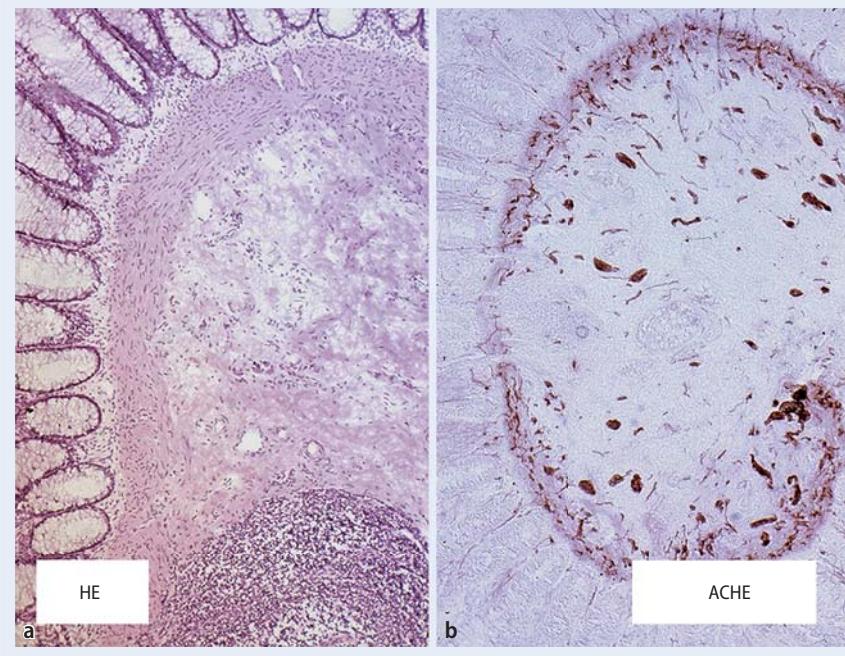


Abb. 4 ▲ Das klassische Bild eines ultrakurzen M. Hirschsprungs: **a** HE-Färbung. **b** Acetylcholinesterase-Darstellung derselben Schleimhautbiopsie

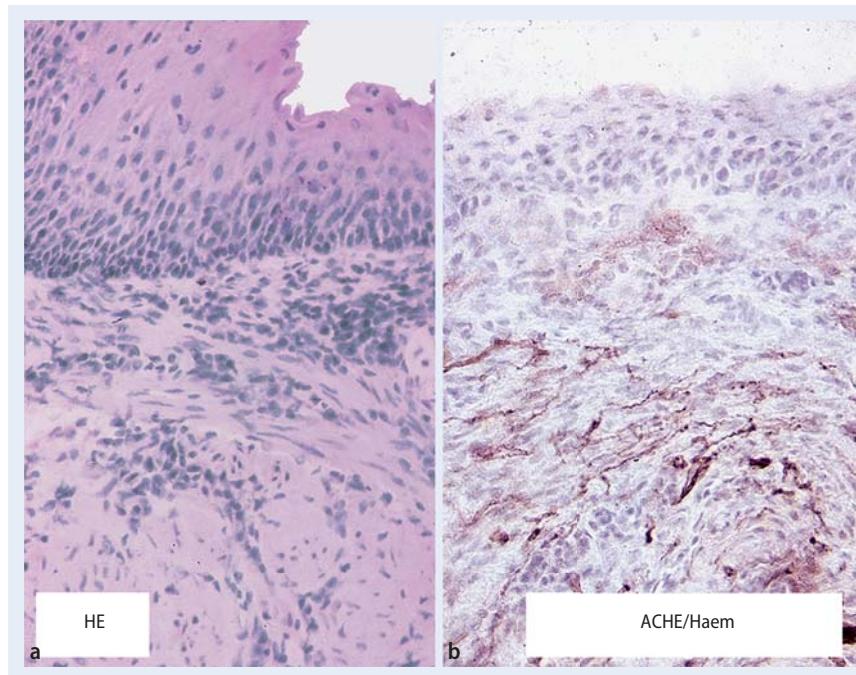


Abb. 5 ▲ Aganglionose des M. corrugator cutis ani. **a** Klassische HE-Färbung. **b** Acetylcholinesterase-Reaktion desselben Gewebes

esterase-Darstellung an nativen Kryostatschnitten nicht verzichten. Das trifft ganz besonders auf den ultrakurzen M. Hirschsprung sowie die Aganglionose des Analrings, des M. corrugator cutis ani und des Sphincter internus zu. Für Labore, welche nur selten Biopsien mit der Frage eines M. Hirschsprung zu

untersuchen haben, sind kommerziell erhältliche enzymhistochemische Reaktionskits zweckmäßig, da diese bei 40°C längerfristig vorrätig gehalten werden können (Districhem, Hohlweg 25, CH-4104 Oberwil, E-Mail: districhem@bluewin.ch oder Bio-Optica, Via San Faustino 58, I-20134 Milano).

Korrespondierender Autor

Dr. E. Bruder

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstraße 40, 4031 Basel, Schweiz
elisabeth.bruder@unibas.ch

Interessenkonflikt. Es besteht kein Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen. Die Präsentation des Themas ist unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

Literatur

1. Polak JM, Van Noorden S (1982) Immunochemistry. Practical Application in Pathology and Biology. Wright, Boston
2. Heitz PU, Komminoth P (1990) Biopsy diagnosis of Hirschsprung's disease and related disorders. *Curr Topics Pathol* 59: 257–275
3. Abu-Alfa AK, Khan DF, West AB et al. (1987) Cathepsin D in intestinal ganglion cells: a potential aid to diagnosis in suspected Hirschsprung's disease. *Am J Surg Pathol* 21: 201–205
4. Tatekawa Y, Kanchiro H, Kano Kogi H et al. (2000) The evaluation of meconium disease by distribution of cathepsin D in intestinal ganglion cells. *Pediatr Surg Int* 16: 53–55
5. Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H et al. (1996) Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 111: 901–910
6. Wedel T, Spiegler 7, Soellner St et al. (2002) Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 123: 1459–1467
7. Wedel T, Roblick UJ, Ott V et al. (2002) Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 45: 54–62
8. Meier-Ruge WA (1965) Anwendung und Aussagewert der Fermenthistochemie in der speziellen und experimentellen Pathologie. *Med Lab* 18: 193–225
9. Meier-Ruge WA (1966) Das Gliom und seine Differentialdiagnose im enzymhistochemischen Bild. *Z Krebsforsch* 68: 276–283
10. Meier-Ruge W (1967) Medikamentöse Retinopathie. In: Bargmann W, Doerr W (Hrsg) *Zwangl Abhandlungen auf dem Gebiet der norm Anat und pathol Anat* No 18. Thieme Stuttgart, S1–86
11. Meier-Ruge W (1968) Das Megacolon. Seine Diagnose und Pathophysiologie. *Virchows Arch* 344: 67–85
12. Meier-Ruge WA, Bruder E (2005) Pathology of chronic constipation in pediatric and adult coloproctology. Karger, Basel
13. Meier-Ruge WA, Bruder E (2005) Preparation of cryostat sections from biopsies and colorectal specimens. *Pathobiology* 72: 93–94
14. Virchow R (1847) Ueber die Standpunkte in der wissenschaftlichen Medizin. *Virchows Arch* 1: 5–19
15. Virchow R (1849) Die naturwissenschaftliche Methode und die Standpunkte in der Therapie. *Virchows Arch* 2: 3–37