

¹А.К. Загоруйко, ¹Т.Г. Филоненко, ²А.В. Килесса

Оптимизация эндомикроскопических и морфологических критериев диагностики глютенной энтеропатии

¹Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского,
²Клиническое объединение «Генезис» МОЗ АР Крыма

Ключевые слова: эндоскопия, морфология, диагностика, глютенная энтеропатия.

Целью настоящей работы явилась оптимизация эндоскопических и морфологических критериев диагностики целиакии на основе современных методов исследования. Настоящая работа основана на результатах клинического, эндоскопического и морфологического, в том числе и иммуногистохимического исследования 40 больных глютенной энтеропатией по классификации Marsh 1-2. Фиброгастроуденоскопию осуществляли на видеоэндоскопической станции Olympus Evis Exera 2, с увеличением кратности в 74-111 раз, с использованием функции узкоспектральной визуализации (Narrow band imaging). Иммуногистохимическое исследование проводили в парафиновых срезах с использованием первичных антител Ki-67 и CD3 (DAKO). Комплексный анализ результатов эндомикроскопического и морфологического исследований позволил верифицировать диагностические параметры согласно классификации Marsh, а также выделить диффузную и очаговую формы глютенной энтеропатии. Микровидеоэндоскопическая диагностика глютенной энтеропатии позволяет оптимизировать забор биопсийного материала для последующего морфологического исследования. Использование иммуногистохимических реакций позволило наиболее точно в соответствии с классификацией Marsh 1-2 определить количество интраэпителиальных лимфоцитов (Marsh 1 – 43,3±1,3 позитивных CD3, Marsh 2 – 58,2±1,7), а также пролиферативную активность крипт при целиакии (Marsh 1 – 3,9±0,1 позитивных Ki-67, Marsh 2 – 44,7±1,8). Полученные результаты являются диагностическими маркерами, обеспечивающими раннее выявление заболевания. Установленная взаимосвязь эндоскопических и морфологических маркеров глютенной энтеропатии позволила оптимизировать диагностический алгоритм заболевания.

Оптимізація ендомікроскопічних та морфологічних критеріїв діагностики глютенної ентеропатії

О.К. Загоруйко, Т.Г. Филоненко, О.В. Килесса

Метою цієї роботи є оптимізація ендоскопічних і морфологічних критеріїв діагностики целиакиї на основі сучасних методів дослідження. Робота ґрунтується на результатах клінічного, ендоскопічного та морфологічного, у тому числі й імуногістохімічного дослідження 40 хворих глютенною ентеропатією за класифікацією Marsh 1-2. Фіброгастроуденоскопію проводили на відеоендоскопічній станції Olympus Evis Exera 2, зі збільшенням кратності в 74-111 разів, з використанням функції вузькоспектральної візуалізації (Narrow band imaging). Матеріалом для гістологічного й імуногістохімічного дослідження були біоптати слизової дванадцятипалої кишки. Імуногістохімічне дослідження проводили в парафінових зрізах з використанням первинних антитіл Ki-67 і CD3 (DAKO) і системи візуалізації En vision за загальноприйнятою методикою. Комплексний аналіз результатів ендомікроскопічного та морфологічного досліджень дозволив верифікувати діагностичні параметри згідно з класифікацією Marsh, а також виділити дифузну й осередкову форми глютенної ентеропатії. Микровідеоендоскопічна діагностика глютенної ентеропатії дозволяє оптимізувати забір матеріалу біопсії для подальшого морфологічного дослідження. Використання імуногістохімічних реакцій дозволило найточніше, відповідно до класифікації Marsh 1-2, визначити кількість інтраепітеліальних лімфоцитів (Marsh 1 – 43,3±1,3 позитивних CD3, Marsh 2 – 58,2±1,7), а також пролиферативну активність крипт (Marsh 1 – 3,9±0,1 позитивних Ki-67, Marsh 2 – 44,7±1,8). Отримані результати є діагностичними маркерами, що забезпечують раннє виявлення захворювання. взаємозв'язок ендоскопічних і морфологічних маркерів глютенної ентеропатії дозволяє оптимізувати діагностичний алгоритм захворювання.

Ключові слова: ендоскопія, морфологія, діагностика, глютенна ентеропатія

Патологія. – 2009. – Т.6, №2. – С.23-26

Optimization of endomicroscopic and morphological diagnostic criteria of gluten enteropathy

A.K. Zagorulko, T.G. Filonenko, A.V. Kilessa

The aim of the present work was optimization of endoscopic and morphological criteria of diagnostics of coeliac disease on the basis of modern methods of research. The present work is based on results of clinical, endoscopic and morphological investigations including immunohistochemical research of 40 patients with gluten enteropathy according to Marsh's classification 1-2. Fibrogastrroduodenoscopy carried out at video-endoscopic station Olympus Evis Exera 2, with frequency rate augmentation in 74-111 times, with function use of narrow band imaging, which allows to spend endomicroscopy of a mucous membrane of a duodenum and to make a topical taking of a histological material. Material for histological and immunohistochemical research were received by biopsy of a mucous membrane of duodenum. Immunohistochemical research was performed in paraffinic sections with use of primary antibodies Ki-67 and CD3 (DAKO). The complex analysis of results of endomicroscopic and morphological researches has allowed to verify diagnostic parameters according to Marsh's classification, and also to allocate diffuse and focal forms of gluten enteropathy. Microvideoendoscopic diagnostics of gluten enteropathy allows optimizing sampling of biopsy material for the subsequent morphological research. Use of immunohistochemical reactions has allowed to define most precisely quantity of intraepithelial lymphocytes (Marsh 1 – 43,3±1,3 positive CD3, Marsh 2 – 58,2±1,7), according to Marsh's classification 1-2 and also proliferative activity of crypts (Marsh 1 – 3,9±0,1 positive Ki-67, Marsh 2 – 44,7±1,8). The received results are the diagnostic markers, providing early revealing the disease. The established interrelation of endoscopic and morphological markers of gluten enteropathy has allowed optimizing diagnostic algorithm of disease.

Key words: endoscopy, morphology, diagnostics, gluten enteropathy.

Pathologia. 2009; 6(2): 23-26

Глютеновая энтеропатия (ГЭП) (coeliacia; греч:koilikos – кишечный, страдающий расстройством кишечника; син.: целиакия), – хроническое генетически детерминированное заболевание, характеризующееся стойкой непереносимостью глютена (злаковый белок) с развитием гиперрегенераторной атрофии слизистой оболочки тонкой кишки и связанного с ней синдрома мальабсорбции.

Распространённость глютенной энтеропатии в популяции колеблется в широких пределах, по данным различных исследователей, – от 1:500 до 1:3000 со средним значением 1:1000 [1, 2, 3, 4].

Известно, болезнь провоцируется употреблением в пищу глютен-содержащих продуктов из пшеницы, ржи, ячменя, овса. Согласно недавним наблюдениям, эти пептиды играют ключевую роль в патогенезе целиакии. Предполагаемые молекулярные механизмы развития данной патологии многофакторны, но, по-видимому, в основе индукции аутоиммунных процессов лежит селективное детерминирование глутаминовых остатков глиадина ферментом тканевой трансглутаминазой (tTG), превращающей пептиды глиадина в глютенные пептиды [2].

В настоящее время диагностика глютенной энтеропатии основана на: а) Клинических проявлениях (диспептические расстройства; нарушения обмена белка; нутритивная недостаточность; анемия; гипо- и авитаминозы; недостаточность надпочечников; заболевания кожи; бесплодие; невынашиваемость беременности; изменения поведения;

б) эндоскопической визуализации [1];

в) использование серологической диагностики [5, 7, 8], которая даёт основание в случае положительных результатов, выполнение биопсии двенадцатиперстной кишки (ДПК) с последующим гистологическим и иммуногистохимическим анализом микропрепаратов [7, 8, 9].

Динамика и стадийность атрофического процесса при целиакии впервые описана Маршем [5, 6, 8] и в настоящее время является одной из самых известных. Считают, что главным доказательством правильно поставленного диагноза «целиакия» является обратное развитие морфологических изменений в слизистой оболочке тонкой кишки после лечения аглютенной диеты.

Целью настоящей работы стала оптимизация эндомикроскопических и морфологических критериев диагностики целиакии на основе современных методов исследования.

Материалы и методы

Настоящая работа основана на результатах клинического, эндоскопического и морфологического, в том числе гистологического и иммуногистохимического исследования 40 больных глютенной энтеропатией по классификации Marsh 1–2. Контрольной группой (n=20) считались пациенты, имеющие эндоскопические и морфологические признаки в норме. Фиброгастроудо-

деноскопию осуществляли на видеоскопической станции Olympus Evis Exera 2, с увеличением кратности в 74-111 раз, с использованием функции узкоспектральной визуализации (Narrow band imaging), которая позволяет провести эндомикроскопию слизистой оболочки ДПК и произвести топический забор гистологического материала. Материалом для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования считались биоптаты слизистой ДПК. Гистологическое исследование проводили по стандартной методике с окраской гематоксилин-эозин. ИГХ исследование проводили в парафиновых срезах с использованием первичных антител Ki-67 и CD3 (ДАКО) и системы визуализации En vision по общепринятой методике (7). Полученные результаты оценивали согласно классификации Marsh (6).

Результаты исследования и их обсуждение

При эндоскопической визуализации ДПК в норме слизистая оболочка представляет собой ворсинчатую структуру бледно-розового цвета, ворсины правильной формы, расположены вертикально, или незначительно наклонены, верхушки ворсин закруглены, высота ворсин более 500 мкм. При эндоскопической визуализации слизистой оболочки ДПК у больных глютенной энтеропатией имеет ворсинчатую структуру, однако, ворсины имеют белесоватый цвет, различную высоту (менее 500 мкм); отмечается деформация, неправильная форма, утолщение, удлинение и уменьшение в диаметре рядом находящихся ворсин, снижение их тонуса (так как находятся в горизонтальном положении), некроз верхушек ворсин. В некоторых случаях отмечается очаговость изменений при проведении эндомикровидеоэндоскопии слизистой оболочки ДПК, участки с характерными изменениями ворсин от 3 до 5мм, чередующиеся с участками слизистой оболочки, при которых ворсины визуально не изменены (рис. 1).



Рис. 1. Эндомикротография. Очаговая глютенная энтеропатия.

Диагностические критерии эндомикроскопической визуализации слизистой ДПК при целиакии по классификации Marsh 1–2

Характеристика ворсин	Глютенная энтеропатия		Контроль n=20
	Marsh 1 n=20	Marsh 2 n=20	
Форма	Правильная	Деформирована, часть ворсин с поврежденными верхушками	Правильная
Цвет	Белесоватые верхушки	Белесоватые верхушки	Бледно-розовая
Расположение	хаотичное, косо-горизонтальное	Горизонтальное	Равномерное, Вертикальное, или косо-вертикальное
Высота	Более 500мкм	Менее 500 мкм	Более 500 мкм
Толщина	Более 200 мкм	Менее 100мкм	Менее 200мкм

Комплексный анализ результатов эндоскопического и морфологического исследований позволил верифицировать диагностические параметры согласно классификации Marsh, а также выделить диффузную и очаговую формы глютенной энтеропатии. С целью оптимизации диагностических эндомикроскопических критериев создана таблица, отражающая основные патологические изменения слизистой ДПК при целиакии.

При оценке эндомикроскопической картины учитывали состояние ворсин, а именно форму, цвет, расположение, а также измеряли высоту и толщину ворсин (табл. 1).

Анализируя эндомикроскопическую картину у пациентов с диагностированной целиакией Marsh 1 было установлено, что форма и высота ворсин не отличались от нормы. Цвет ворсин изменялся от бледно-розового в норме до белесоватого в патологии. Отмечали также хаотичное косо-горизонтальное расположение ворсин и их утолщение в патологических зонах.

Эндомикроскопическая картина у пациентов с диагнозом целиакии Marsh 2 позволила выявить деформацию и горизонтальное расположение ворсин, причем высота и толщина их снижалась по сравнению с эндомикроскопической картиной при целиакии Marsh 1.

При гистологическом исследовании биоптатов слизистой ДПК обращали внимание, в первую очередь, на правильно ориентированный фрагмент с целью обзорного определения патологического процесса, оценки формы и количества ворсин.

Первая стадия целиакии (инfiltrативная) согласно классификации Marsh представлена слизистой оболочкой с нормальной архитектурой кишечных ворсин и крипт, но с увеличением количества интерэпителиальных лимфоцитов (ИЭЛ) в ворсинах. Как известно, и в нормальном эпителии встречаются от 2 до 10 ИЭЛ на 100 энтероцитов [1]. Количественные критерии увеличения числа ИЭЛ, представленные разными авторами, варьируют от 21 до 40 ИЭЛ на 100 энтероцитов [2].

Использование иммуногистохимической реакции с CD3 позволило более тщательно выявить ИЭЛ среди энтероцитов. Результаты иммуногистохимических реакций оценивали путем выявления количества клеток, в которых выявлялось позитивное внутриядерное окрашивание на 100 клеток. В норме внутриядерная экспрессия CD3 составила $4,0 \pm 0,5$. У больных целиакией Marsh 1 позитивные CD3 лимфоциты определялись как на апикальной поверхности энтероцитов, так и на базальной мембране и составили $43,3 \pm 1,3$ (рис. 2, см. цв. вкладку3).

Пролиферативную активность энтероцитов в криптах оценивали с помощью антител к Ki-67, антигену, который экспрессирует в G₁, S и G₂ фазах клеточного цикла. Внутриядерная экспрессия Ki-67 в криптах имела очаговый характер и практически соответствовала норме – $3,9 \pm 0,1$. Архитектоника ворсин сохранена. Соотношение высоты ворсины к крипте в 100% случаев соответствовала норме (не менее 3:1). В строме слабо выраженная лимфоплазматитарная инфильтрация. Степень активности воспаления слабая.

Вторая стадия по Маршу (гиперпластическая) характеризовалась увеличением глубины крипт с усилением пролиферативной активности энтероцитов при сохраненной архитектонике кишечных ворсин и увеличенном количестве ИЭЛ. При этом нарушается нормальное соотношение высоты ворсин и глубины крипт. Соотношение ворсины к крипте менее 3:1 обнаруживали в 50% в каждом биоптате. Количество позитивных CD3 ИЭЛ соответствовало $58,2 \pm 1,7$. Пролиферативная активность энтероцитов крипт резко возрастала и составила $44,7 \pm 1,8$ позитивных Ki-67 клеток (рис. 3, см. цв. вкладку3).

В строме определялась умеренно-выраженная лимфоплазматитарная инфильтрация. Кроме того в 20% случаев отмечали гиперплазию лимфоидных фолликулов с расширением герменативных центров. Степень активности воспаления в 50% случаев – умеренная.

Морфологические критерии диагностики глютеновой энтеропатии по классификации Marsh 1–2

Морфологические признаки	Глютеновая энтеропатия		Контроль n=20
	Marsh 1 n=20	Marsh 2 n=20	
Форма	Правильная	Деформирована, часть ворсин с десквамацией энтероцитов	Правильная
Соотношение ворсины к крипте	3:1 и более	50% менее 3:1	3:1 и более
ИЭЛ (CD3)	43,3±1,3	58,2±1,7*	4,0±0,5
Гиперплазия крипт. Проллиферативный индекс (Ki 67)	3,9±0,1*	44,7±1,8	3,7±0,4
Лимфоплазмацитарная инфильтрация	слабая	умеренная	–
Лимфоидные фолликулы	–	20%	–
Степень активности воспаления	слабая	50% умеренная	–

Примечание: * – достоверность отличия показателей групп по отношению к контролю (p=0,003)

С целью оптимизации диагностических критериев создана таблица гистологических и иммуногистохимических характеристик глютеновой энтеропатии (табл. 2).

Выводы

1. Анализ эндомикроскопической картины выявил наличие очаговой формы глютеновой энтеропатии, которая, возможно, предшествует диффузной форме.

2. Микровидеоэндоскопическая диагностика глютеновой энтеропатии позволяет оптимизировать забор биопсийного материала для последующего морфологического исследования.

3. Использование иммуногистохимических реакций позволило наиболее точно определить количество интраэпителиальных лимфоцитов и пролиферативную активность крипт при целиакии в соответствии с классификацией Marsh 1–2 и обеспечить раннюю диагностику заболевания.

5. Установленная взаимосвязь эндомикроскопических и морфологических маркеров глютеновой энтеропатии позволила оптимизировать диагностический алгоритм заболевания.

Литература

1. Черняховская Н.Е. Эндоскопическая диагностика пищевода, желудка и тонкой кишки /Н.Е.Черняховская, В.Г.Андреев, Д.П.Черепянец// Москва, –2006, С.149 – 175
2. Auricchio.S. Gluten-sensitive enteropathy in childhood /S.Auricchio, L.Greco, R.Troncone// *Pediatr.Clin.North.Am.* – 1988. – V.35. – №1. – P.157 – 87.
3. Nibo O. Childhood coeliac disease in Estonia: efficacy of the IgA-class antigliadin antibody test in the search for new cases /O.Nibo // *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* – 1992. – V.102. – P.330 –354.
4. Rampal P. Maladie coeliaque et regime sans gluten / P.Rampal, C.Cadot // *Gastroent.Clin.Biol.* – 1990. – V.14. – P.T22 –T25.
5. Catassi C. Antiendomysium versus antigliadin antibodies in screening the general population for coeliac disease /C.Catassi, G.Fanciulli, A.R.D'Appello// *Scand. J. Gastroenterol.* 2000; – №35. – P.732 –736.
6. Marsh M(1992). «Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')» /M. Marsh// *Gastroenterology.* – 1992. – №102(1). – P.330–354.
7. Sategna-Guidetti C. Serum Ig A antiendomysium antibody as a marker of intestinal involvement and diet compliance in adult celiac sprue/ C.Sategna-Guidetti, R.Pulitano, S.Cross// *J. Clin. Gastroenterol.* – 1993. – V.17 – P.123 – 127
8. Serra S. An approach to duodenal biopsies /S.Serra, P.A.Jani // *J. Clin. Pathol.* 2006. – №59. – P.1133–1150
9. Corazza G.R. Coeliac disease /G.R. Corazza, V.Villanacci// *J. Clin. Pathol.* – 2005. –№58. – P.573–574.

Сведения об авторах:

Загорулько Александр Кимович, д. мед. н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии с секционным курсом КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Филоненко Татьяна Григорьевна, кандидат. мед. н., доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом КГМУ им. С.И. Георгиевского.

Килесса Александр Владимирович, врач высшей категории, эндоскопист-гастроэнтеролог клинического объединения «Генезис» МОЗ АР Крима.

Контактный телефон: 8-050-398-17-29.