

УДК 616.341– 002 : 616.342 : 611:616 – 072:616-079

© А. В. Килесса, А. К. Загорулько, Т. Г. Филоненко, 2011.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЛЮТЕНОВОЙ ЭНТЕРОПАТИИ

А.В. Килесса, А.К. Загорулько, Т.Г. Филоненко

Клиника «Генезис» (директор Т. А. Сайкова) МОЗ АР Крыма.

Кафедра патологической анатомии (зав. каф. профессор А. К. Загорулько), ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского», г.Симферополь.

NEW APPROACHES TO THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF GLUTEN ENTEROPATHY

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

SUMMARY

Objective: to identify opportunities for differential diagnosis of gluten enteropathy using high resolution endoscopy and immunohistochemical methods. It was established that the state of villous structures with gluten enteropathy, studied during the high-resolution endoscopy, have characteristic symptoms, as assessed by Z-scale. Investigation of mucosal biopsies of the duodenum with the conduct of staining with hematoxylin - eosin can not reliably establish a tissue diagnosis. Use of immunohistochemical markers to CD3, CD8 lymphocytes and monoclonal antibodies to Ki67 mitotic activity in enterocytes allows us to establish a tissue diagnosis and to the differential diagnosis of gluten enteropathy.

НОВІ ПІДХОДИ ДО ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЛЮТЕНОВОЮ ЕНТЕРОПАТІЇ

А. В. Килесса, О. К. Загорулько, Т. Г. Филоненко

РЕЗЮМЕ

Мета дослідження: виявити можливості диференціальної діагностики глютенною ентеропатії з використанням ендоскопії високої роздільної здатності та імуногістохімічних методів дослідження. Встановлено, що стан ворсинчастий структур при глютенною ентеропатії, вивчених при проведенні ендоскопії високого дозволу, мають характерні ознаки, що визначаються за Z-шкалі. Дослідження біоптатів слизової оболонки дванадцятипалої кишки з проведенням фарбування гематоксилін - еозин не дозволяє достовірно встановити патоморфологічно діагноз. Використання імуногістохімічних маркерів до CD3, CD8 лімфоцитів і моноклональних антитіл Ki67 до мітотично активним ентероцитах дозволяє встановити патоморфологічно діагноз і провести диференційну діагностику глютенною ентеропатії.

Ключевые слова: глютенная энтеропатия, дифференциальная диагностика.

В настоящее время глютенная энтеропатия (ГЭП) рассматривается как ненормальный иммунный ответ слизистой оболочки тонкой кишки на глиадин [1]. Учитывая высокую генетическую предрасположенность к глютенной энтеропатии, приближающуюся к 40% среди общей популяции населения [2] и высокую смертность среди больных ГЭП (по сравнению с общей популяцией населения более чем в 4 раза [3]) ранняя диагностика ГЭП представляется чрезвычайно актуальной.

Использование серологических тестов не может в полной мере демонстрировать клиническую значимость, в связи с тем, что выявление специфических антител становится возможным, чаще всего при развитии деструктивных изменений в слизистой тонкой кишки (Marsh IIIС) [4,5,6].

Появление с 2004 года эндоскопических технологий с использованием режимов высокого увеличения (HME), высокого оптического разрешения (HRE) и узкоспектральной визуализации (NBI) позволили использовать данный метод в скрининге ГЭП, при которой состояние ворсинчатой структур слизистой

оболочки оценивается по Z (zoom) - шкале [7], при этом стало возможным не только детальная оценка состояния ворсин, но и проведение топического забора гистологического материала, особенно, при очаговых формах ГЭП.

Доказана 100% корреляционная взаимосвязь между данными эндоскопии высокого увеличения и данными гистологического исследования при диагностике ГЭП [8]. Как известно, основными гистологическими критериями ГЭП по классификации предложенной Marsh [9] является подсчет количества межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), измерение соотношения высоты ворсин к глубине крипт и наличие атрофии ворсин, что в совокупности позволяет установить патоморфологический диагноз.

Однако, использование в большинстве гистологических лабораторий обзорной окраски биоптатов гематоксилином и эозином не позволяет достоверно интерпретировать полученные данные при недеструктивных стадиях ГЭП (Marsh I-II) и провести дифференциальную диагностику ГЭП, между другими заболеваниями двенадцатиперстной кишки,

имеющих схожие гистологические проявления.

Цель исследования - выявить возможные дифференциально – диагностические признаки состояния ворсинчатых структур при проведении эндоскопии высокого разрешения и увеличения, узкоспектральной визуализации в сопоставлении с иммуногистохимическими дифференциально – диагностическими признаками глютеновой энтеропатии

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашей практике за период с 2008 по 2010 годы было проведено 324 исследования двенадцатиперстной кишки с использованием эндоскопии в режимах HRE, HME и NBI.

Во всех случаях изучалось состояние ворсинчатых структур слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Состояние ворсинчатых структур оценивалось с использованием Z-шкалы [7], с последующим топическим забором слизистой двенадцатиперстной кишки для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Биоптаты фиксировали 10% забуференным формалином, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм.

Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. ИГХ исследование проводили по стандартизированной методике с использованием парафиновых блоков и реактивов компании DAKO: моноклональных антител CD8-лимфоцитов (Clone C8/144B), CD3-лимфоцитов (Clone F7.2.38), Ki-67 (Clone MIB-1), системы визуализации FLEX, на автостейнере фирмы DAKO [11]. Фотографирование проводили цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе OLYMPUS CX 41. Морфометрический анализ проводился с помощью программы «DPSoft».

Оценку уровня экспрессии CD8+, CD3+, Ki-67 проводили с учетом интенсивности окрашивания и распределения моноклональных антител в процентном эквиваленте при подсчете на 100 клеток. Подсчет индекса экспрессии CD8+, CD3+ проводили в строме и между эпителием. При подсчете индекса экспрессии Ki-67 в энтероцитах, который обнаруживается в митотически активных клетках, судили о пролиферативной активности клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании обзорной окраски биоптатов слизистой двенадцатиперстной кишки гематоксилином и эозином патоморфологическая верификация глютеновой энтеропатии вызывала значительные затруднения. Мы столкнулись с проблемой дифференциации и точного подсчета межэпителиальных лимфоцитов, а также точного измерения соотношения высоты ворсин к глубине крипт, что является патогномоничными признаками для ГЭП.

Известно, что инфильтрация МЭЛ может наблюдаться не только при ГЭП, но и при других воспалительных заболеваниях двенадцатиперстной кишки

инфекционной и неинфекционной природы [1]. Использование иммуногистохимического маркера к CD3+ лимфоцитам [10] позволило определить точное распределение общего пула лимфоцитов как в строме так и в межэпителиальной зоне. При выявлении CD3+ МЭЛ свыше 30 на 100 энтероцитов слизистой двенадцатиперстной кишки мы считали, что правомочно думать о наличии ГЭП. Но в большинстве случаев мы отмечали от 30% до 60% случаев инфильтрацию CD3+ в строме, что расценивался как признак хронического воспалительного процесса.

Усиление экспрессии CD8+ МЭЛ свыше 30 на 100 энтероцитов в ворсинах двенадцатиперстной кишки в общем пуле Т-лимфоцитов позволило более точно определить наличие глютеновой энтеропатии, так как усиливается действие Т-лимфоцитов супрессоров в ответ на патологическую иммунную реакцию.

Установлено, что состояние ворсинчатых структур двенадцатиперстной кишки, при проведении эндоскопии высокого увеличения (HME), высокого разрешения (HRE) и узкоспектральной визуализации (NBI) при ГЭП имеют характерные признаки, отличимые от других воспалительных заболеваний двенадцатиперстной кишки.

У 197 пациентов был диагностирован хронический дуоденит различной степени активности воспаления. Индекс экспрессии CD3+ Т-лимфоцитов в межэпителиальной зоне был в пределах 10-30%, в строме 30%-70%. Индекс экспрессии CD8+ Т-лимфоцитов в межэпителиальной зоне был в пределах 0-10%, в строме 5%-10%. Пролиферативная активность (индекс экспрессии Ki-67) в энтероцитах крипт ворсин была в пределах 10%-30%. Низкая экспрессия CD8+ Т-лимфоцитов в межэпителиальной зоне и строме среди повышенного общего пула CD3+ Т-лимфоцитов позволил диагностировать хронический воспалительный процесс различной степени выраженности.

У 127 пациентов была диагностирована ГЭП различной стадии в зависимости от общепринятой классификации Marsh [4,5,6]. Из них у 67 пациентов индекс экспрессии CD8+ Т-лимфоцитов в межэпителиальной зоне был в пределах 30-70%, в строме 5%-10%. Пролиферативная активность энтероцитов (индекс экспрессии Ki-67) составила 10%, что не отличалось от контрольных показателей в норме. Такая ИГХ картина расценивалась как инфильтративная стадия ГЭП (Marsh I) и соответствовала эндоскопической визуализации в режимах HRE, HME и NBI по шкале V-2 (рис. 1, 2).

У 38 пациентов была диагностирована гиперпластическая стадия ГЭП (Marsh II), основным признаком которой является не только наличие МЭЛ, но и пролиферация эпителия крипт, т.е. митотическая активность энтероцитов крипт. При этом пролиферативная активность энтероцитов составила 16%-50%, несмотря на то, что соотношение ворсин к крипте

оставалось сохранным (3:1) и также соответствовала эндоскопической визуализации в режимах HRE, HME и NBI по шкале Z-2. У 22 пациентов диагностирована атрофическая стадия ГЭП (Marsh III), которая представляла трудную дифференциально-диагностическую задачу. При этом наблюдалась высокая экспрес-

сия CD8+ МЭЛ-супрессоров (70%-80%) и стромальных CD8+ (50-70%), высокая пролиферативная активность энтероцитов крипт (50%-70%) при резком снижении соотношения ворсины к крипте (1:1), эндоскопически визуализировались изменения соответствующие шкале Z-3.

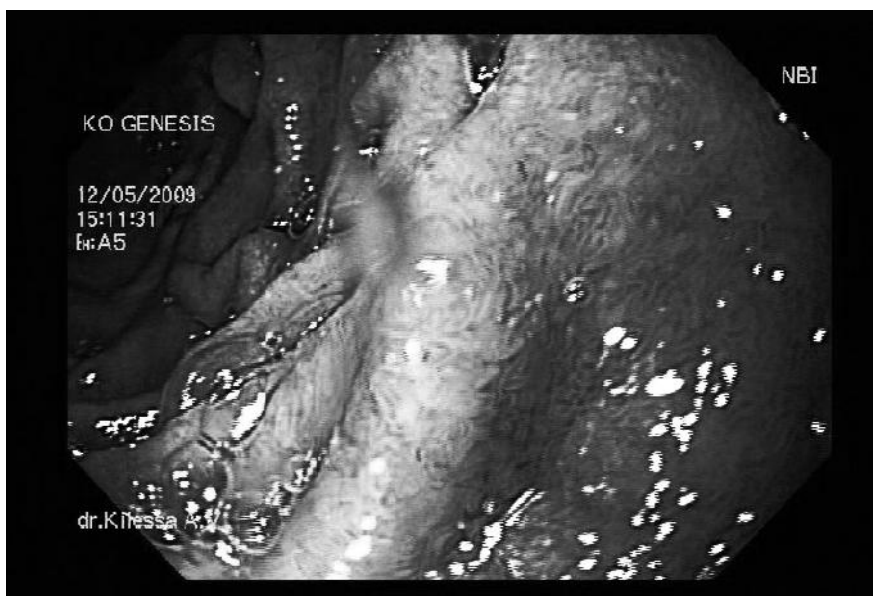


Рис.1. HME, HRE, NBI. Ворсины тип Z-2 (очаговая форма).

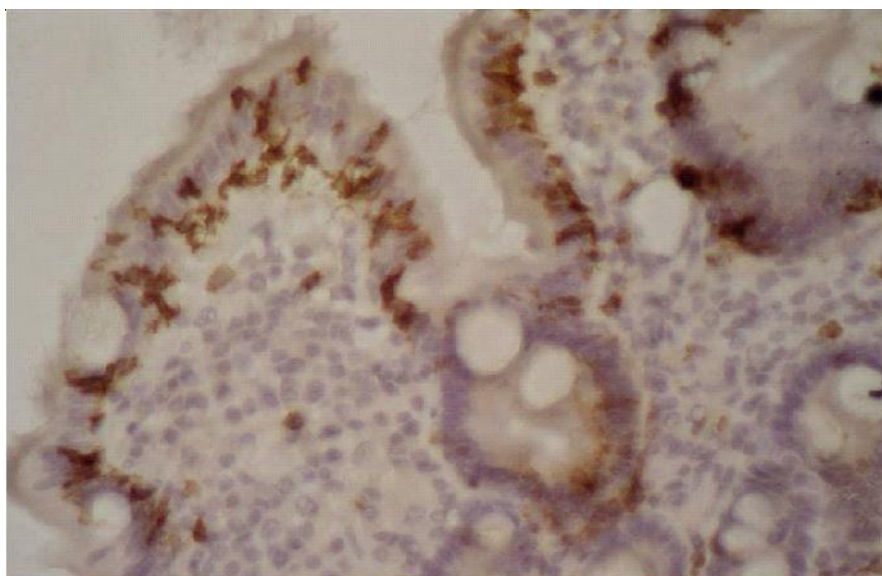


Рис.2. ГЭП, инфильтративная стадия (Marsh 1). Экспрессия CD8+ лимфоцитов в межэпителиальной зоне. ИГХ. Система визуализации FLEX. Ув.400.

ВЫВОДЫ

Таким образом, совокупность методов диагностики ГЭП: исследование ворсинчатых структур двенадцатиперстной кишки в режимах HRE, HME и NBI, топический забор гистологического материала, гистологическое исследование биоптатов с обзорной окраской гематоксилином и эозином, применение

стандартизированного иммуногисто-химического исследования с моноклональными антителами CD3, CD8 и Ki67, морфометрический анализ с использованием программного обеспечения «DPSoft» позволяет не только выявить ранние морфологические изменения ГЭП (Marsh I-II), но провести дифферен-

циальную диагностику с другими воспалительными заболеваниями двенадцатиперстной кишки.

Высокий индекс экспрессии CD8+ Т-лимфоцитов супрессоров в межэпителиальной зоне является наиболее четким и патогенетически обоснованным дифференциально-диагностическим признаком развития ГЭП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Парфёнов А. И. Энтерология // А.И. Парфёнов // Руководство для врачей. 2-е изд. «Медицинское информационное агенство» – Москва. – 2010. – 670с.
2. Martin F. Kagnoff. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease // Martin F. Kagnoff / The Journal of Clinical Investigation. – 2007. – Vol. 117. – №1. – P.41 – 49.
3. Alberto Rubio-Tapia. Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease // Alberto Rubio-Tapia, Robert A. Kyle, Edward L. Kaplan, et al. // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137. – Issue 1. – P.88 – 93.
4. Oberhuber G. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists // G. Oberhuber, G. Granditsch, H. Vogelsang // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 1999 – Vol. 11 – P. – 1185 – 1194
5. Tursi A. Low prevalence of antigliadin and anti-endomysium antibodies in subclinical silent coeliac disease // A. Tursi, G. Brandimarte, G. Giorgetti, A. Gigliobianco, et al // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – №96. – P.1507 – 1510.
6. Julian A. Abrams. Seronegative Celiac Disease: Increased Prevalence with Lesser Degrees of Villous Atrophy // Julian A. Abrams, Beverly Diamond et al. // Digestive Diseases and Sciences. – 2004. – Vol. 49. – №4. – P. 546–550.
7. Badreldin R. How good is zoom endoscopy for assessment of villous atrophy in coeliac disease? // R. Badreldin, P. Barrett, D.A. Wooff, J. Mansfield, Y. Yiannakou // Endoscopy. – 2005. – № 37. – P. 994 – 998.
8. Cammarota G. Direct visualization of intestinal villi by high - resolution magnifying upper endoscopy: a validation study // G. Cammarota, A. Martino, G.A. Pirozzi, R. Cianci, et al. // Gastrointestinal Endoscopy. – 2004. – № 60. – P.732 – 738;
9. Marsh M.N. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity // M.N. Marsh // Crowe Ballieres Clinical Gastroenterology. – 1995. – № 9 – P. 273 – 293;
10. Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text / Fenoglio-Preiser, Cecilia M.; Noffsinger, Amy E. et al. / 3rd Edition Copyright B©2008 Lippincott Williams & Wilkins. – P.714–724;
11. David Dabbs. Diagnostic immunohistochemistry // David Dabbs // «Sanders». Philadelphia. – 2010. – 952p.