

КОЛОМАЦКАЯ ПОЛИНА БОРИСОВНА

**КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ
В ДИАГНОСТИКЕ ПИЩЕВОДА БАРРЕТТА**

14.01.12 - онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2014

Работа выполнена в ФГБУ «Российский научный центр рентгенрадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор - член-корреспондент РАМН, профессор, заслуженный врач РФ Солодкий Владимир Алексеевич)

Научные руководители:

член-корреспондент РАМН, профессор **Солодкий Владимир Алексеевич**

доктор медицинских наук, профессор **Синев Юрий Викторович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Соколов Виктор Викторович**, руководитель эндоскопического отделения ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцен» Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор **Терещенко Сергей Григорьевич**, руководитель эндоскопического отделения ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Ведущее учреждение: ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России

Защита диссертации состоится « 24 » ноября 2014 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 208.081.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, 86.

Автореферат разослан « ____ » октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.м.н., профессор

З.С. Цаллагова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы

Диагностика пищевода Барретта (ПБ) - чрезвычайно важная проблема, находящаяся на стыке онкологии и патологической анатомии. Это обусловлено, в первую очередь, тем, что ПБ является факультативным предраком с высокой (20-30%) частотой малигнизации, и до 80-90% случаев аденокарциномы дистального отдела пищевода развивается на фоне ПБ (Alcedo J. et al, 2009, Bhat S. et al., 2011, Desai T.K. et al., 2012, Jung K.W. et al., 2011). Риск аденокарциномы пищевода (АКП) у больных с ПБ превышает таковой по популяции в 30 раз и, в среднем, в течение жизни у пациентов с ПБ составляет 10% (Hvid-Jensen F. et al., 2011, Solaymany-Dodaran M. et al., 2005). Необходимо также отметить, что 5-летняя выживаемость больных с аденокарциномой пищевода на фоне ПБ остается крайне низкой (Чиссов с соавт., 2012, Sharma P. et al., 2005, Solaymany-Dodaran M. et al., 2013).

ПБ можно отнести к относительно часто встречающимся заболеваниям, так как он является осложнением широко распространенной гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ). Согласно многочисленным мультицентрическим исследованиям, проводимым в разных странах, количество пациентов с симптомами ГЭРБ составляет в Европе 60%, в США-20%, в России 7-12% (Кайбышев В.О. с соавт., 2011, Katz P. et al., 2013, Schwarz S. et al., 2013). Частота же выявления ПБ, по данным ряда публикаций, составляет 2,4% -4% в среднем по популяции (Johansson J. et al. 2005, Peery A.F. et al., 2012). Но выявление аденокарциномы пищевода у больных, не наблюдавшихся ранее по поводу ПБ, свидетельствует о том, что значительное количество случаев ПБ остается не диагностированным (Conio M. et al., 2001, Crane S.J. et al., 2007).

Эндоскопическое исследование является ключевым при постановке диагноза ПБ(Curvers W.L. et al., 2010). Тогда как остальные методы (рентгеновский, сцинтиграфия) могут лишь предположить этот диагноз, эндоскопический метод может с высокой степенью вероятности установить его (окончательный диагноз пищевода Барретта устанавливается при морфологическом исследовании биоптата, Давыдов с соавт., 2003, ASGE Standards of Practice Committee, 2012). В последнее время в диагностике и скрининге ПБ все чаще используются современные эндоскопические технологии: аутофлюоресцентная эндоскопическая диагностика, увеличительная и узкоспектральная эндоскопия (Genta R.M. et al., 2006, Shahid M.W. et al., 2010).

Но наиболее перспективным в плане диагностики и оценки этапов неопластической прогрессии ПБ представляется методика конфокальной лазерной эндомикроскопии (Kantsevov S.V. et al., 2009, Keisslich R. et al., 2008, Wang T.D. et al.

2005). По результатам нового метода осуществлялись первые попытки классификации типов патологии (Goetz M. et al., 2006, Keisslich R. et al., 2008).

Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) является инновационным и уникальным методом эндоскопической визуализации, который дает возможность в реальном масштабе времени получать изображение слизистой оболочки (СО) с 1000-кратным увеличением и, являясь, по сути, прижизненной микроскопией. Разрешающая способность аппарата доходит до 0,7 микрон, а глубина изучения ткани достигает 250 мкм, что позволяет не только визуализировать клетки поверхностного эпителия, но и оценить структуру lamina propria, и, в конечном счете, выполнить прицельную «умную» биопсию подозрительных участков СО (Vajbouj M. et al., 2010, Neumann H. et al., 2010). По мнению ряда авторов, внедрение в эндоскопическую практику КЛЭМ (DePalma G.D., 2009, Meining A., 2009, Wallace M.B. et al), обеспечит сравнимую с иммуноморфологическим исследованием биоптатов, диагностическую точность. На основании проведенного в Германии пилотного исследования на базе клиники Horst-Schmidt (г. Висбаден) и Universitatsklinik (г. Майнц), был сделан вывод, что применение КЛЭМ уменьшает количество последующих диагностических биопсий в 4 раза (Keisslich R., 2011).

Исследования возможностей КЛЭМ при ПБ находятся на начальной стадии. В частности, не изучены особенности архитектоники слизистой оболочки пищевода, характерные для его нормального состояния, кишечной метаплазии, дисплазии, не осуществлены морфо-эндоскопические сопоставления и, как следствие, отсутствует единая классификация, систематизирующая эндомикроскопическую и морфологическую картину. Нет и четко сформированных показаний для проведения данного вида обследования. Это обусловлено тем обстоятельством, что данный вид диагностики практически еще не имеет широкого распространения. Так, конфокальная лазерная эндомикроскопия в настоящее время в России применяется для обследования больных не более чем в 3–5 клиниках Москвы и Санкт-Петербурга где возможности КЛЭМ используются в бронхологии педиатрии, диагностике желудочных неоплазий (Аверьянов А.В. с соавт., 2011, Брехов Е.И. с соавт., 2014, Шавров А.А. мл. с соавт., 2013).

Цель исследования

Определение возможностей метода конфокальной лазерной эндомикроскопии для повышения точности эндоскопической диагностики пищевода Барретта у пациентов, страдающих гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью.

Задачи исследования

1. На основании морфо-эндомикроскопических сопоставлений выявить особенности архитектоники слизистой оболочки пищевода, характерные для его нормального состояния, кишечной метаплазии, дисплазии.

2. Определить диагностические возможности и значимость лазерной конфокальной эндомикроскопии в диагностике ПБ и ассоциированных с ним неоплазий.
3. Провести сравнительный анализ данных, полученных при использовании традиционной 4-х квадрантной «слепой» биопсии и лазерной конфокальной эндомикроскопии.
4. Определить место конфокальной лазерной эндомикроскопии в диагностике пищевода Барретта и определить показания для использования методики в первичной диагностике больных с пищеводом Барретта и в процессе динамического наблюдения за пациентами с морфологически подтвержденным диагнозом.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации апробирована и оценена диагностическая значимость новой эндоскопической методики - конфокальной лазерной эндомикроскопии в диагностике пищевода Барретта во время стандартной эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС). Установлен сравнительно невысокий уровень диагностической точности метода, являющегося до сих пор «золотым стандартом» в постановке диагноза ПБ, который подразумевает выполнение так называемых «слепых» биопсий в четырех точках по окружности пищевода и на протяжении каждого сантиметра по длине сегмента предполагаемой цилиндроклеточной метаплазии в дистальном отделе пищевода.

Описаны варианты архитектоники слизистой оболочки пищевода при пищеводе Барретта и этапах его неопластической прогрессии в сопоставлении с морфологическими данными, разработана его эндомикроскопическая семиотика.

Установлено, что конфокальная лазерная эндомикроскопия позволяет в высоком разрешении визуализировать различные типы эпителиальных клеток и выявлять характерные эндомикроскопические признаки, как для ПБ, так и для этапов его неопластической прогрессии. Клеточные и сосудистые изменения ПБ и ассоциированные с ним неоплазии могут быть определены с высокой точностью. Выявлено наличие эндомикроскопической и соответствующей ей морфологической гетерогенности сегмента пищевода Барретта. Показано, что ультракороткий сегмент метаплазированного эпителия в пищеводе при конфокальной лазерной эндомикроскопии представлен желудочными типами эпителия, что впоследствии подтверждено результатами гистологического исследования.

Практическая значимость

По результатам научного исследования разработаны и внедрены в клиническую практику методики конфокальной лазерной эндомикроскопии пищевода. Использование КЛЭМ в диагностике заболеваний пищевода позволило:

- значительно повысить эффективность диагностики Пищевода Барретта и связанных с ним диспластических изменений слизистой оболочки пищевода;
- сформулировать эндомикроскопические критерии ПБ, неоплазий, ассоциированных с ПБ и метаплазии желудочного типа;
- предложить способ атравматичного динамического контроля за состоянием слизистой оболочки дистального отдела пищевода после эндоскопического лечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод КЛЭМ позволяет визуализировать морфологические структуры слизистой оболочки органов ЖКТ. Обладая высокой чувствительностью и специфичностью в отличие от повсеместно распространенного метода эзофагогастродуоденоскопии с 4-х квадрантной биопсией, считающегося «золотым стандартом» в диагностике ПБ, он является высокоинформативным диагностическим методом в распознавании ПБ и неоплазии слизистой оболочки пищевода.
3. Технические характеристики метода позволяют проводить исследования в реальных клинических условиях и совмещать его с рутинным эндоскопическим исследованием. Эндомикроскопические изображения слизистой уточняют характер эндоскопических признаков.
3. Метод КЛЭМ с высокой точностью визуализирует границы различных морфологических состояний слизистой оболочки дистального отдела пищевода.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на XIV Российской гастроэнтерологической неделе (2009г), заседании общества специалистов эндоскопии пищеварительного тракта г. Москвы (2010г). Апробация работы состоялась на научно-практической конференции ФГБУ РНЦРР МЗ РФ 28 апреля 2014.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 научные работы в центральных периодических изданиях, рекомендуемых ВАК РФ.

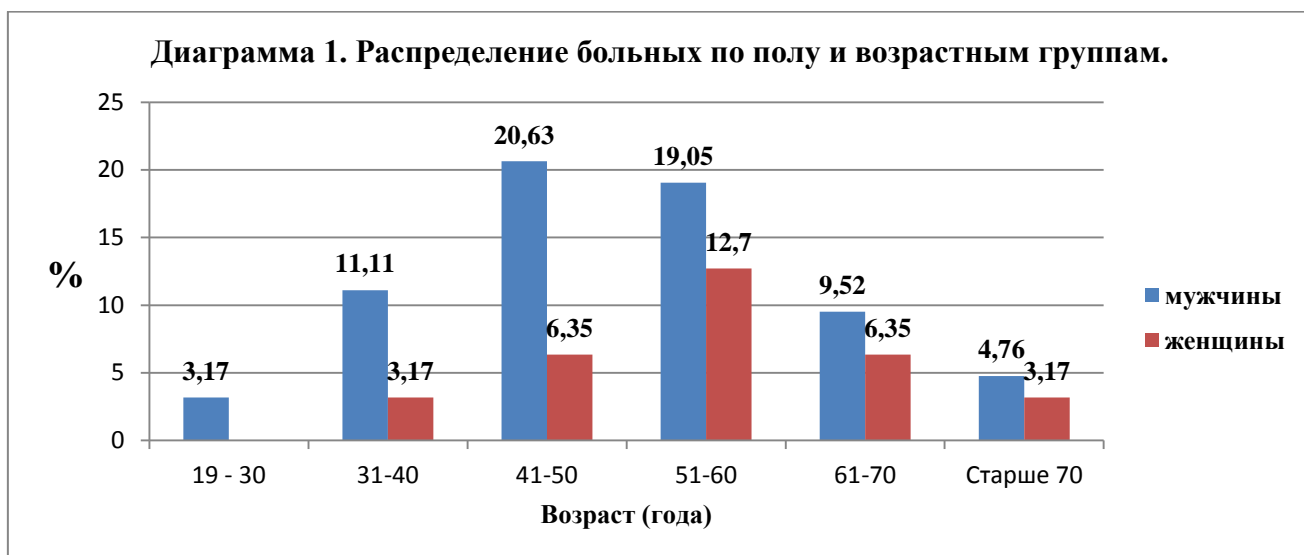
Структура и объем работы

Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, состоящего из 19 отечественных и 130 иностранных источников. Диссертация проиллюстрирована 25 таблицами и 28 рисунками.

Материалы и методы исследования

В период с 2009 по 2013 гг. были обследованы 63 пациента с клинической картиной ГЭРБ, проходившие обследование или находящиеся на стационарном лечении в Российском научном центре рентгенрадиологии. Всем пациентам диагностическая эзофагогастродуоденоскопия проводилась с забором биопсийного материала СО пищевода. Суммарно осуществлено 197 эндоскопических исследований, получено 471 биоптатов.

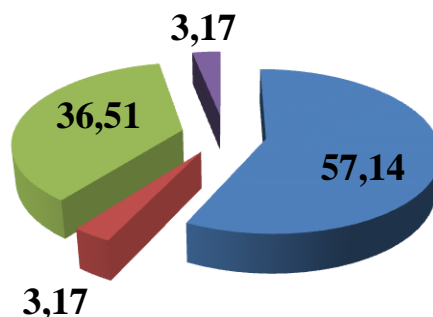
Среди 63 обследованных пациентов преобладали мужчины, которых было 43 человека, количество женщин составило 20. Возраст пациентов, включенных в исследование, составлял от 19 до 78 лет. Средний возраст пациентов составил $56,7 \pm 11,2$ год. Подавляющее количество больных (74,6%) относилось к возрастной группе 41 - 70 лет (диаграмма 1).



В исследование были включены пациенты с длительными (более 13 лет) симптомами гастроэзофагеального рефлюкса и подозрением на ПБ, а также пациенты с установленным диагнозом ПБ. Из них с направительным диагнозом ГЭРБ, осложненная ПБ, обследовано 36 пациента, 2 - с направительным диагнозом «полип пищевода» и 2 пациентов после вмешательства на верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Остальным 23 больным исследование было выполнено в плане комплексной диагностики при опухолевой патологии других органов (диаграмма 2).

Диаграмма 2. Распределение больных по направлению диагноза.

- ГЭРБ, осложненный предположительно развитием пищевода Барретта
- Полип пищевода
- Обследование по поводу опухолевой патологии и неопухолевых заболеваний
- Обследование после гастрэктомии и проксимальной субтотальной резекции желудка



Для сравнения и объективизации полученных результатов нами первоначально всем 63 пациентам была проведена ЭГДС с применением видеоэндоскопических систем Fujinon EG-590 WR и Olympus GIF 150 и выполнением стандартной четырехквadrантной биопсии: 4 биопсии различных участков эндоскопически предполагаемого поражения СО пищевода (на расстоянии около 1 см друг от друга, на 2 см проксимальнее Z-линии). Для забора биопсийного материала использовались фенестрированные биопсийные щипцы FB-25K-1 фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Затем после стандартной ЭГДС с 4-квadrантной биопсией всем 63 пациентам выполнялась комплексная ЭГДС с конфокальной лазерной эндомикроскопией СО дистального отдела пищевода и биопсией. В нашей работе для получения конфокальных изображений СО пищевода использовалась эндомикроскопическая система Cellvizio, разработанная и сконструированная фирмой Mauna Kea Technologies (Франция).

Для получения высококонтрастного конфокального изображения в исследовании использовался флуоресцеин натрия 10% (Флуоресцеин Новартис 100мг/мл, Novartis Pharma AG, Switzerland) в дозировке 2,5 – 5 мл внутривенно.

Для исключения артефактов, вызванных кашлем, непреднамеренными движениями пациентов и снижения интенсивности перистальтических сокращений мышечного слоя пищевода и желудка во время всех исследований с КЛЭМ применялось анестезиологическое пособие путем глубокой седации с использованием внутривенного гипнотика пропофола 1% (дозировка рассчитывалась индивидуально в соответствии с длительностью исследования). После внутривенного введения флуоресцеина у всех пациентов возникло незначительное желтушное окрашивание кожных покровов и видимых слизистых, которое исчезло во всех случаях в течение 60-90 минут. 28 пациента (44,4%) отметили темное окрашивание мочи в течение 2-х

суток после исследования. Никаких других побочных эффектов зафиксировано не было.

Все полученные при эзофагоскопии биоптаты фиксировали в 10% забуференном формалине, обезживали в спиртах восходящей плотности и заливали в парафин по общепринятой методике. На микротоме Leica (Германия) готовились парафиновые срезы, толщиной 5-7 мкм, и окрашивались гематоксилином Эрлиха и эозином. Исследование проводилось с помощью световой микроскопии (Leica DM LS 2) с увеличением 45-600.

Через 7 дней после проведенной комплексной ЭГДС были выбраны наугад 40 эндомикроскопических записей хорошего качества (20 пациентов), включающих изображения как проксимальных, так и дистальных отделов пищевода, зоны Z-линии. Эндомикроскопические записи повторно оценивались тремя исследователями независимо друг от друга без учета личности пациента, анамнеза, жалоб и эндоскопической картины.

Для анализа воспроизводимости классификации использован метод оценки согласия экспертов (каппа Коэна), который на сегодняшний день является основополагающим методом для оценки совпадений заключений. При проведении расчетов оценивали результаты парного сравнения показателей («каждый с каждым»). Рассчитывали медиану от всех значений каппы для каждого исследователя – индивидуальный показатель согласия, и медиану от полученных индивидуальных показателей – генеральная взвешенная каппа. Это предусматривало двухэтапный просмотр материала с оценкой уровня согласия между наблюдателями. Взвешенная каппа рассчитана для номинальных параметров (градация и стадия неопластической прогрессии), невзвешенная – бинарных (есть ПБ/ нет ПБ).

Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.6.0, StatSoft Inc (США).

Результаты собственных исследований

Результаты ЭГДС без применения конфокальной лазерной микроскопии (4-х квадрантная биопсия)

На этом этапе работы с целью оценки диагностической эффективности методики была выполнены 63 рутинные эзофагоскопии, осуществлена визуальная оценка 284 участков СО пищевода, из которых был осуществлен забор биопсийного материала. Среднее число мест забора материала у одного пациента составило $4,5 \pm 0,5$. Критериями выбора места биопсии являлись:

- 1) красноватая «желудочно-подобная», «бархатистая» СО дистального отдела пищевода различной протяженности, распространяющаяся в проксимальном направлении от розетки кардии в виде циркулярно расположенного участка СО либо в виде красноватых «язычков пламени» различной протяженности, локализующихся выше розетки кардии, между которыми видна по окраске бледноватая неизменная СО пищевода. Биопсия выполнялась крупными щипцами минимум из 4 точек с интервалом 1 см;
- 2) эрозивно-язвенные дефекты пищевода в области предполагаемого сегмента метаплазии;
- 3) участки с измененным мелко-зернистым гиперплазированным рельефом СО дистального отдела пищевода.

Кишечная метаплазия плоского эпителия пищевода неполного типа (толстокишечная) при анализе результатов морфологического исследования биоптатов СО пищевода из «бархатисто-красных» участков обнаружена только в 35,2% случаев. Большая часть (54,93%) биоптатов была представлена метаплазией эпителия желудочного типа (кардиальные и фундальные типы метаплазии согласно морфологической классификации метаплазии) и кардиальным эпителием без признаков кишечной метаплазии (38,93% и 16% биоптатов соответственно). В 3 (1,0%) биоптатах была выявлена аденокарцинома на фоне ПБ, при этом при визуальном осмотре такой диагноз не был предположен ни в одном случае (таблица 1).

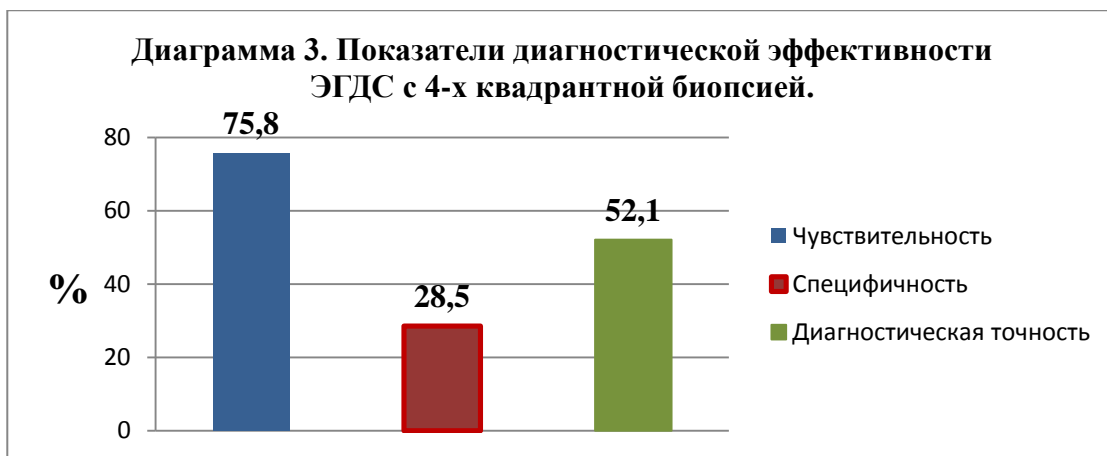
При гистологическом исследовании биоптатов из краев эрозивно-язвенных дефектов пищевода чаще всего (30,0 %) обнаруживалась кишечная метаплазия плоского эпителия без явлений дисплазии и метаплазия желудочного типа (20%) (таблица 1).

При оценке морфологического исследования биоптатов из мелкозернистых участков СО пищевода неполная кишечная метаплазия плоского эпителия была обнаружена в 30% (n= 6) , в 10% (n=2) случаев выявлена слабая, а в 30,0 % (n=6) - тяжелая дисплазия эпителия. В 20% случаев выявлена аденокарцинома на фоне ПБ (таблица 1).

Таблица 1. Морфологические данные биоптатов слизистой оболочки пищевода из участков ярко-красного, бархатистого, «желудочно-подобного» эпителия, из краев эрозированных дефектов пищевода и из мелкозернистых участков слизистой пищевода.

Данные морфологического исследования	Количество биоптатов абс. (%)		
	ярко-красная, бархатистая СО	Эрозированные дефекты СО	мелкозернистые участки СО
Плоскоклеточный эпителий	5 (2,05%)	1 (5,0%)	-
Фундальный эпителий	5 (2,05%)	-	-
Кардиальный эпителий	39 (16,0%)	3 (15,0%)	-
КМ плоскоклеточного эпителия неполного типа	86 (35,2%)	5 (30,0%)	6 (30,0%)
КМ плоскоклеточного эпителия полного типа	4 (1,64%)	2 (10,0%)	-
Метаплазия эпителия желудочного типа	95 (38,93%)	4 (20,0%)	-
Дисплазия легкой степени	6 (2,5%)	2 (10,0%)	2 (10,0%)
Дисплазия тяжелой степени	1 (0,41%)	1 (5,0%)	6 (30,0%)
Аденокарцинома	3 (1,22%)	1 (5,0%)	4 (20,0%)
Грануляционная ткань	-	-	2 (10%)
Всего	244 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

Было установлено, что при достаточно высокой чувствительности метода в отношении кишечной метаплазии плоского эпителия - $75,8\% \pm 3,3\%$, специфичность его крайне низка - $28,5 \pm 2,4\%$, что обеспечивает диагностическую точность немногим более 50% ($52,1\% \pm 2,9\%$) (диаграмма 3).



Диагноз Пищевода Баррета в итоге был поставлен 31,75% (n=20) пациентов, дисплазия легкой степени – 6,35% (n=4), дисплазия тяжелой степени – 11,11 % (n=7), и аденокарцинома пищевода была выявлена в 6,35% (n= 4). Таким образом, ПБ и ассоциированные изменения были выявлены у 55,56% (n=35) (Таблица 2). У остальных пациентов определялся желудочный тип эпителия - 36,50% (n= 23) и нормальные типы эпителия (плоскоклеточный, кардиальный, фундальный) – 7,93% (n=5).

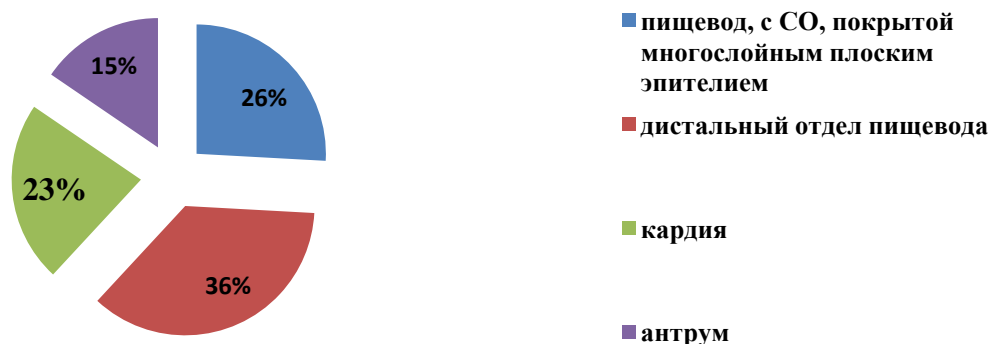
Результаты ЭГДС с конфокальной лазерной эндомикроскопией.

У всех 63 пациентов, включенных в исследование, через 21 день (± 3 дня) после выполнения стандартной ЭГДС с 4- квадрантной биопсией, одними из первых в РФ было апробировано и проведено комплексное эндоскопическое обследование с использованием конфокальной лазерной эндомикроскопии.

КЛЭМ выполнялась по всей окружности пищевода и протяженности визуально измененной СО дистального отдела пищевода а также в области «языков пламени». Из интересующих участков СО бралась прицельная биопсия. Среднее число мест забора материала у одного пациента составило $2,5 \pm 0,2$, что почти в 2 раза меньше, чем при проведении 4-х квадрантной биопсии.

В общей сложности было получено 683 конфокальных записей, средней продолжительностью 3 мин. 20 сек ± 1 мин. 5 сек, включающих 433 различных участка верхних отделов ЖКТ (пищевод, с СО, покрытой многослойным плоским эпителием, 112 участков; дистальный отдел пищевода, 156; кардия, 98, антральный отдел желудка, 67) (диаграмма 4).

Диаграмма 4. Участки СО верхних отделов ЖКТ, из которых получены конфокальные записи

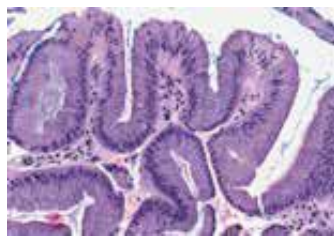
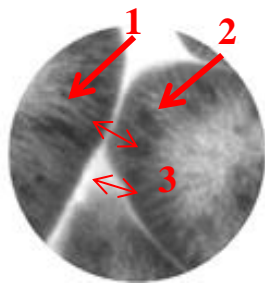


Записями и изображениями с хорошим качеством были признаны 38% (260) всех полученных. Снижение качества получаемых конфокальных изображений происходило, в основном, из-за артефактов из-за движений пациентов (смазанные, нечеткие картинки), а также из-за неправильно подобранной дозы флуоресцеина натрия (при превышении оптимальной дозы в 2,5 мл изображение получалась слишком светлым).

Идентификация полученных микроизображений производилась на основании сопоставления эндоскопической картины, конфокального и гистологического изображения одного и того же участка слизистой пищевода. Путем параллельного гисто - эндомикроскопического анализа определялись оптические феномены, присущие здоровой слизистой и всем видам железистых метаплазий в пищеводе. Оценивались размеры, форма, ориентация, глубина залегания клеточных и тканевых структур.

Все обнаруженные нами типы клеточной и сосудистой архитектоники, отличной от нормальной эндомикроскопической картины слизистой оболочки дистального отдела пищевода, мы разделили на три основных типа.

Было установлено, что характерная виллезная структура цилиндрического эпителия с темными овальными бокаловидными клетками, содержащими муцин и, не окрашивающиеся, таким образом, флуоресцеином, обнаруживаются при пищеводе Барретта (рисунок 1).

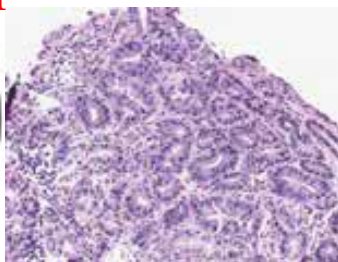
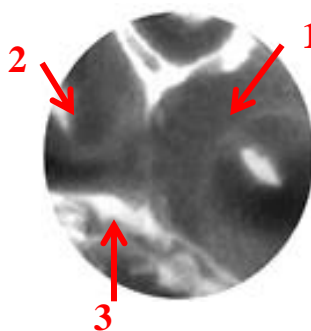


1. Эпителиальные клетки правильной формы
2. Бокаловидные клетки
3. Равноудаленные железы

Рисунок 1. Неполная кишечная метаплазия плоского эпителия дистального отдела пищевода.

При сопоставлении данных конфокальной микроскопии с результатами морфологического исследования биоптатов (количество биоптатов соответствовало количеству исследуемых методом КЛЭМ участков СО пищевода), полученных из участков СО пищевода с ворсинчатой (виллезной) структурой и темными бокаловидными клетками уставлено, что в 93,59% (в 73 участках из 78 изучаемых) эндомикроскопический диагноз пищевод Барретта соответствует кишечной метаплазии неполного типа плоского эпителия пищевода (таблица 4). При этом в биоптатах выявлялись столбчатые эпителиоциты без щеточной каемки с везикулярными ядрами, выраженными ядрышками и бокаловидные клетки, а клетки Панета отсутствовали.

Для второго типа изменений - желудочной метаплазии СО характерно наличие регулярного призматического эпителия с типичными округлой формы выводными протоками желез желудочного типа (кардиальные железы). Сосудистая архитектура представлена несколько расширенными капиллярами правильной формы только в глубоких частях слизистой оболочки (рисунок 2).



1. Призматический эпителий правильной формы и размера
2. Одинаковой округлой формы выводные протоки желез
3. Капилляры правильной формы с эластичными стенками

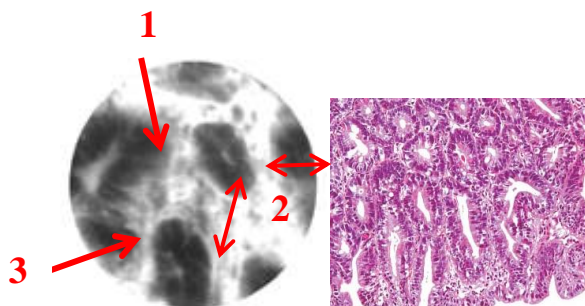
Рисунок 2. Желудочная метаплазия СО дистального отдела пищевода.

При изучении биоптатов полученных из участков СО дистального отдела пищевода, которые КЛЭМ определялись как участки с желудочной метаплазией, в 96% (в 48 участках из 50) выявлялся тип метаплазированного эпителия, типированный как желудочный (Таблица 4).

Морфологически данные биоптаты характеризовались гиперхромностью и умеренной псевдостратификацией ядер, плотным расположением кардиальных желез, а также лимфоцитарной и нейтрофильной инфильтрацией собственной пластинки слизистой. Определялась атрофия СО с эффектом склерозирования.

При описании неопластических изменений СО дистального отдела пищевода (3-й тип изменений) важно учитывать, что флуоресцеин из-за своих фармакологических свойств не окрашивает ядра клеток. Поэтому дифференцировать степень дисплазии эпителия, ранний рак не возможно. Выявленные изменения эпителия, относящиеся к этапам неопластической трансформации ПБ, обобщенно характеризовались нами как неопластические. Обнаруженные изменения метаплазированного эпителия были довольно однотипными, несмотря на разные этапы неопластической трансформации. Возникающая клеточная атипия в пределах СО приводит к потере упорядоченной структуры и тканевой специфичности.

Неопластически измененная СО обуславливает возникновение интенсивного и гетерогенного излучения. Определяются хаотично ориентированные полиморфные и бесформенные крупные темные клетки. Поверхность эпителия приобретает зазубренный вид, ширина слоя эпителиальных клеток уменьшается. Неравноудаленные железы неравных размеров и форм имеют тенденцию к слиянию. На эндомикроскопических изображениях могут быть видны эллипсовидные структуры, соответствующие сосудистым образованиям, что связано с гипертрофией тканей. Извитые капилляры неправильной формы, определяются как в поверхностных, так и в более глубоких слоях слизистой оболочки. Чрезвычайно характерным признаком является чередование очень ярких светлых участков, возникающих из-за утечки флуоресцеина из кровеносных сосудов, приводящих к возникновению резко неоднородного и очень яркого излучения в пределах собственной пластинки слизистой, с «темными зонами», появление которых обусловлено снижением поглощения флуоресцеина метаплазированным эпителием (рисунок 3).



1. Плеоморфные клетки
2. Неправильного размера и формы железы
3. «Зазубренный» вид эпителиальной поверхности

Рисунок 3. Кишечная метаплазия СО пищевода неполного типа с признаками дисплазии

При исследовании биоптатов, полученных из участков СО, определяемых при КЛЭМ как «неопластически» измененных, в 21,43% (n=6) диагностирована дисплазия легкой степени, характеризующаяся увеличением и гиперхроматозом ядер клеток метаплазированного эпителия, увеличением ядерно-цитоплазматического отношения. Дисплазия эпителия ПБ тяжелой степени выявлялась в 42,86% (n=12) (таблица 4). Морфологически определялась клеточная атипия с анизокариозом, значительным гиперхроматозом ядер и резким увеличением ядерно-цитоплазматического отношения, а также распространенной псевдостратификацией.

Аденокарцинома на фоне ПБ была диагностирована в 28,57% (8 участков из 28) при выявлении выраженного полиморфизма ядер клеток, а также, при инвазивном ее варианте - повреждении базальной мембраны (таблица 2).

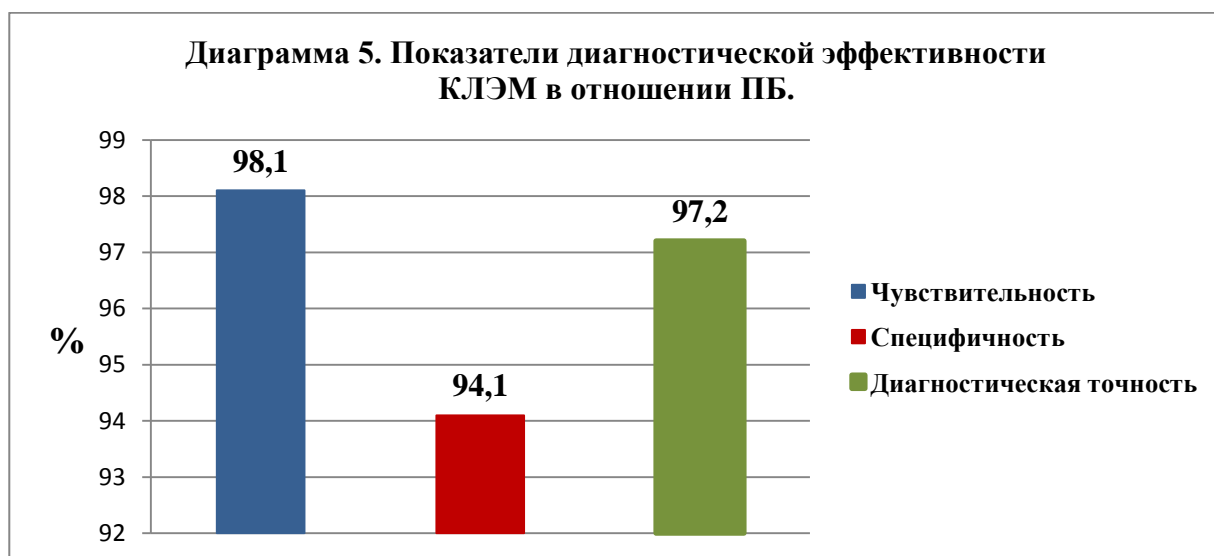
Таблица 2. Морфологические заключения по биоптатам из участков СО пищевода с кишечной метаплазией, из участков с «желудочной метаплазией» и неопластическими изменениями слизистой оболочки пищевода по данным КЛЭМ (156 участков, из которых взята биопсия).

Данные морфологического исследования	Количество биоптатов абс. (%)		
	Кишечная метаплазия	Желудочная метаплазия	Неоплазия
КМ плоскоклеточного эпителия неполного типа	73 (93,59%)	2 (4,0%)	2 (7,14%)
Метаплазия эпителия желудочного типа	3 (3,85%)	48 (96,0%)	-
Дисплазия легкой степени	1 (1,28%)	-	6 (21,0%)
Дисплазия тяжелой степени	1 (1,28%)	-	12 (42,86%)
Аденокарцинома	-	-	8 (28,57%)
Всего	78 (100%)	50 (100%)	28 (100%)

Оценка чувствительности, специфичности и диагностической точности методики КЛЭМ СО дистального отдела пищевода показывает, что методика обеспечивает как крайне высокую чувствительность (98,1%) в отношении пищевода Барретта, так и высокую специфичностью (94,1 %). Диагностическая точность методики составила 96,8 % . Положительная прогностическая ценность - 97,2% , и отрицательная прогностическая ценность - 96,0 % (Таблица 3, диаграмма 5).

Таблица 3. Показатели чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности и отрицательной прогностической ценности КЛЭМ в диагностике ПБ.

Показатель	Значение	90% доверительный интервал	
		Нижний предел	Верхний предел
Чувствительность	98,1 %	96%	99%
Специфичность	94,1 %	86,1%	99%
Положительная прогностическая ценность	97,2 %	91%	100%
Отрицательная прогностическая ценность	96,0 %	90%	100%
Отношение правдоподобия для положительного результата (LR+)	16,6	6,01	38,45
Отношение правдоподобия для отрицательного результата (LR-)	0,02	0,008	0,05



Кроме того, соответствующие ПБ неопластические изменения СО можно было предсказать с чувствительностью 92,9% и специфичностью 98,4 %. Суммарная диагностическая точность составляла 97,4 %, положительная прогностическая ценность - 92,9%; отрицательная прогностическая ценность - 98,4 % (таблица 4, диаграмма б) .

Таблица 4. Показатели чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности и отрицательной прогностической ценности КЛЭМ в диагностике неопластических изменений СО дистального отдела пищевода, связанных с ПБ.

Показатель	Значение	90% доверительный интервал	
		Нижний предел	Верхний предел
Чувствительность	92,9 %	74,2%	96,4%
Специфичность	98,4 %	93,6%	100%
Положительная прогностическая ценность	92,9 %	91,9%	95%
Отрицательная прогностическая ценность	98,4%	96,2%	100%
Отношение правдоподобия для положительного результата (LR+)	58,1	21,06	79,1
Отношение правдоподобия для отрицательного результата (LR-)	0,07	0,02	0,1



В конечном счете, диагноз Пищевода Баррета с помощью КЛЭМ был поставлен 50,8% (n=32) пациентам, при этом дисплазия легкой степени на фоне ПБ – 9,52% (n=6), дисплазия тяжелой степени – 14,29 % (n=9), и аденокарцинома пищевода была выявлена в 7,94% (n= 5). Среднее число мест забора материала у одного пациента составило $2,5 \pm 0,2$.

Отсроченный анализ конфокальных видеозаписей и изображений.

Через 7 дней после комплексного ЭГДС с КЛЭМ были повторно оценены, выбранные методом рандомизации 40 эндомикроскопических записей тремя

исследователями независимо друг от друга без учета личности пациента, анамнеза, жалоб и эндоскопической картины. Исследователи, пройдя индивидуальное обучение методике КЛЭМ, работали в очной форме в различных режимах: первый этап через 7 дней после эндоскопического исследования с эндомикроскопией, второй этап спустя 3 дня после первого этапа с целью оценки воспроизводимости и повторяемости результатов («выживаемость знаний»).

После изучения эндомикроскопических записей производилось оценка чувствительности, специфичности и диагностической точности методики каждым экспертом (диаграмма 7). Было показано, что и отсроченном анализе эндомикроскопических изображения и записей даже без учета эндоскопической картины воспроизводятся высокие показатели чувствительности, специфичности и диагностической точности, что демонстрирует полученные значения коэффициента согласия наблюдателей (таблица 5). Была достигнута очень хорошая (превосходная) степень согласия наблюдателей, что свидетельствует о надежности предложенных участникам теста эндомикроскопических критериев.

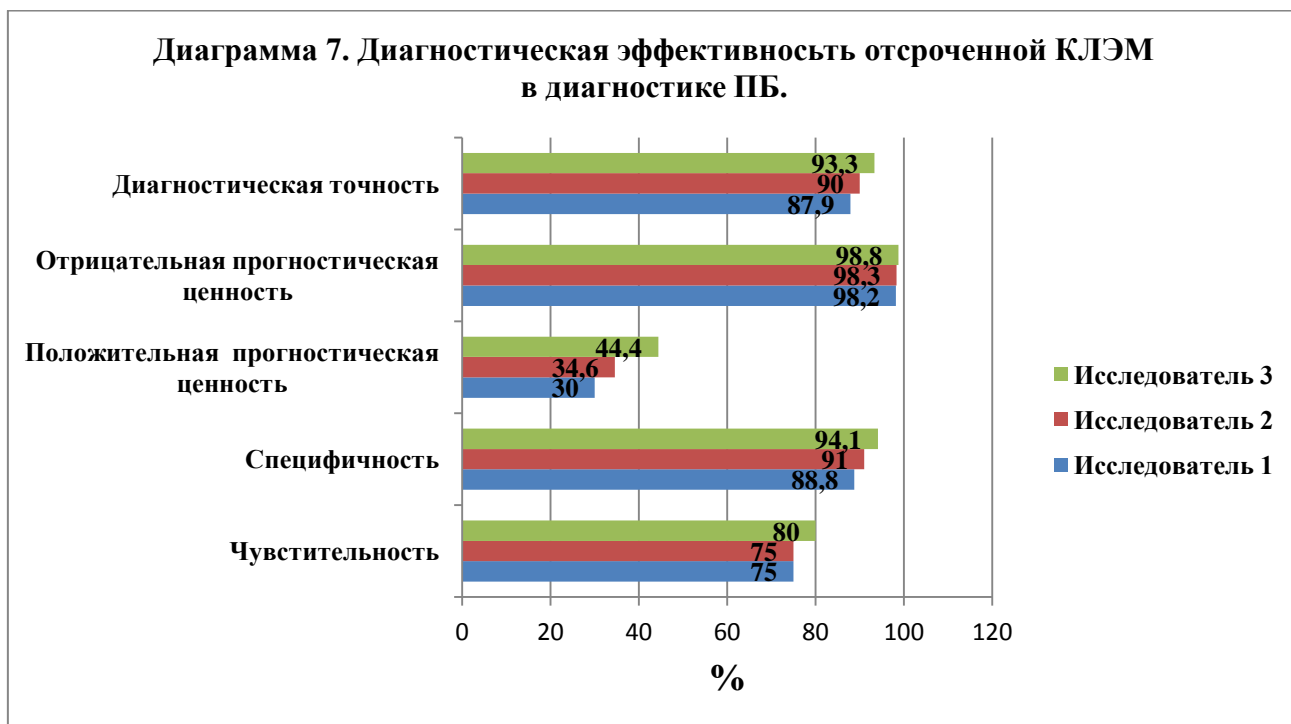
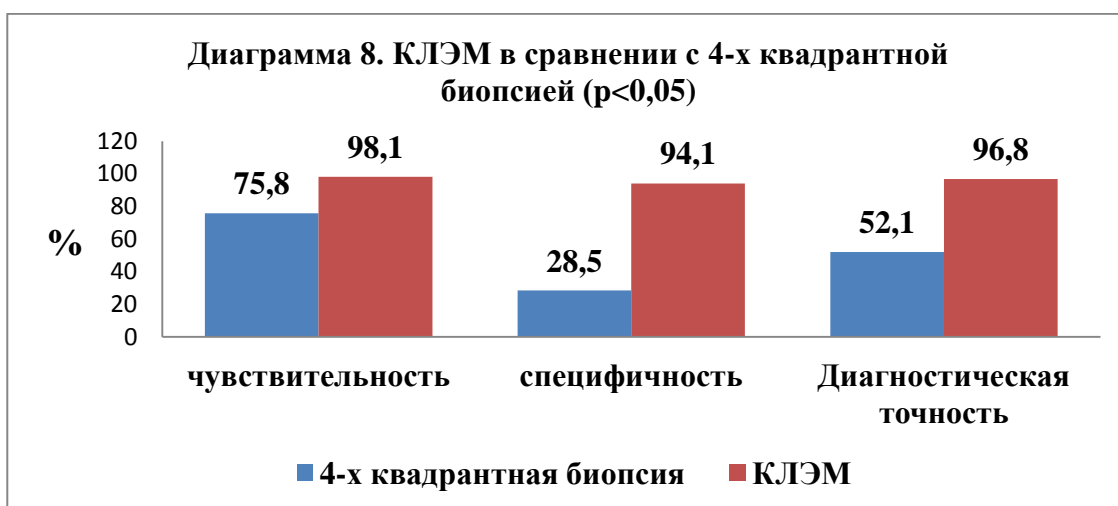


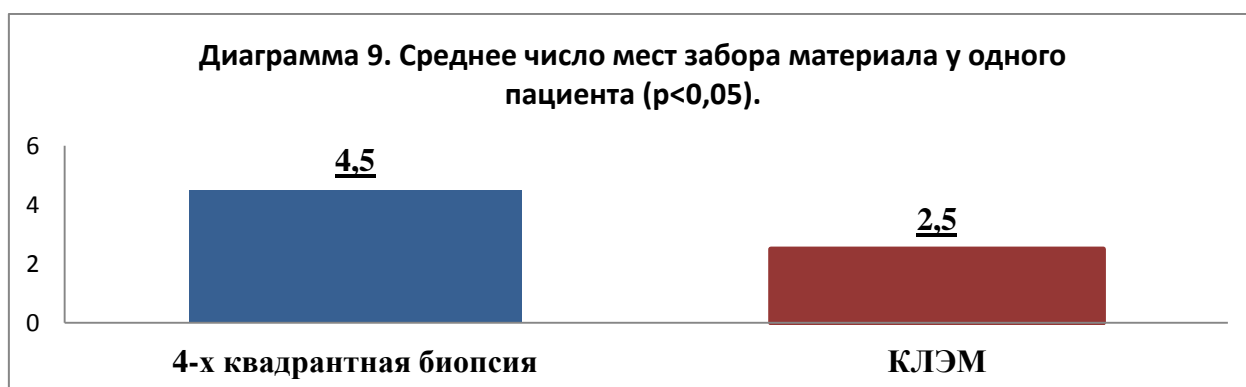
Таблица 5. Значения критерия согласия исследователей (каппа Коэна) при оценке кишечной метаплазии неполного типа (ПБ) слизистой оболочки дистального отдела пищевода.

I этап взвешенная/ невзвешенная каппа		I этап взвешенная/ невзвешенная каппа	
0,843	0,892	0,845	0,896

Полученные в ходе исследования данные демонстрируют очень высокую диагностическую точностью в дифференциальной диагностике типов метаплазии и диспластических изменений в эпителии Барретта при проведении рутинной эндоскопической процедуры. Показатели чувствительности, специфичности методики являются одними из самых высоких среди уточняющих методов диагностики ПБ и достоверно превышает аналогичные показатели метода с четырехквadrантной биопсией, до сих пор считающегося «золотым стандартом» в диагностике ПБ и этапов его неопластической прогрессии (диаграмма 8).



Также количество взятых биоптатов при рутинной эзофагоскопии было необоснованно большим. Так при коротком сегменте количество биоптатов достигало 6, а при длинном сегменте – 10 фрагментов, это в почти 2 раза превышало число биоптатов при КЛЭМ (диаграмма 9). Очевидно, что такая методика получения биопсийного материала заметно увеличивает экономические и временные затраты патоморфологического отделения, а, кроме того, повышает риск развития искусственных осложнений (кровотечения, перфорации). Все вышперечисленное характеризует методику ЭГДС с выполнением четырехквadrантной биопсии, только как метод предварительной диагностики, обеспечивающий возможность лишь предположить наличие ПБ.



Таким образом, все выше перечисленное позволяет считать КЛЭМ, чрезвычайно эффективным методом как при первичной диагностике ПБ, так и в процессе динамического наблюдения за пациентами с ПБ (в том числе подвергшихся эндоскопическому лечению), позволяя своевременно и точно обнаружить неопластическую трансформацию неполной кишечной метаплазии плоского эпителия пищевода. Метод КЛЭМ позволяет с высокой точностью (10-20 мкм) определять истинные размеры патологической зоны и при неопластических изменениях СО дистального отдела пищевода, так как эндомикроскопические границы совпадают с морфологическими. Методика дает возможность врачу – эндоскописту оптимизировать диагностику ПБ, позволяя как минимум выполнить предельно точную прицельную биопсию и, в целом, сократить число биопсии и последующих диагностических процедур, и как максимум безотлагательно приступить к лечебным вмешательствам, что, несомненно, экономит временные и материальные ресурсы.

В результате исследования удалось выявить ограничения метода КЛЭМ при метаплазии СО дистального отдела пищевода. КЛЭМ при данных технических характеристиках устройства и фармакодинамических свойствах используемого флуоресцентного агента способен визуализировать только поверхностные слои СО ЖКТ и не может:

- дифференцировать этапы неопластической прогрессии ПБ;
- визуализировать инвазию ракового процесса и определять её глубину.

Повышение информативности метода КЛЭМ может быть достигнуто несколькими путями: а) техническим совершенствованием устройства (увеличение поля зрения и глубины обзора;

б) улучшением контраста и других оптических свойств исследуемых тканей (применение контрастных агентов, обладающих высокой специфичностью к кислым компонентам клеточных ядер, и обеспечивающих их четкую визуализацию, и позволяет лучше дифференцировать интраэпителиальную неоплазию и ранний рак, например акрифлавин, крезиловый фиолетовый).

Совершенствование метода КЛЭМ в ближайшем будущем, несомненно, приведет к еще большему повышению его информативности, что, возможно, решит вопрос об эндомикроскопической дифференцировке степени дисплазии и визуализации инвазии ракового процесса.

Выводы

1. Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) является неинвазивным, высокоинформативным методом диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта. КЛЭМ позволила установить особенности архитектоники слизистой оболочки пищевода, характерные для его нормального состояния, кишечной метаплазии и

дисплазии, поэтому с высокой точностью прижизненно регистрирует различные морфологические изменения слизистой оболочки дистальной части пищевода.

2. Диагностическая точность метода КЛЭМ в распознавании кишечной метаплазии плоского эпителия неполного типа составляет 96,8%; чувствительность – 98,1%; специфичность- 94,1%. Диагностическая точность метода КЛЭМ в распознавании неопластических изменений слизистой оболочки, ассоциированных с пищеводом Барретта составляет 97,4%; чувствительность – 92,4%; специфичность- 97,4%.

3. Методика четырехквadrантной биопсии, до сих пор считающаяся «золотым стандартом», при достаточно высокой чувствительности - 75,8% обнаруживает крайне низкую специфичность - 28,5%, что и обеспечивает диагностическую точность немногим более 50%.

4. Метод КЛЭМ технически легко совместим с эндоскопическим исследованием, способен уточнять характер эндоскопических признаков широко распространенной гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ).

Практические рекомендации

1. КЛЭМ на данном этапе развития методики должен использоваться совместно с традиционными гистологическим исследованием.

2. При проведении диагностического обследования слизистой оболочки пищевода у пациентов с подозрением на ПБ с помощью метода КЛЭМ следует придерживаться следующей последовательности диагностических мероприятий:

- исследование проводить в условиях медикаментозной седации;
- эндоскопический осмотр слизистой оболочки верхних отделов ЖКТ в белом свете;
- КЛЭМ наиболее измененных участков слизистой под визуальным контролем;
- проведение прицельной биопсии слизистой оболочки пищевода (по показаниям) с учетом данных эндомикроскопического исследования;

3. Включение метода КЛЭМ в комплексное обследование пациентов с подозрением на ПБ или уже установленным диагнозом наиболее целесообразно в следующих клинических ситуациях:

- сомнительная эндоскопическая картина, требующие решения вопроса о необходимости биопсии и месте ее проведения;

- при необходимости точной оценки боковых границ и размеров патологической зоны при проведении эндоскопического лечения ПБ;

- динамический неинвазивный контроль после эндоскопического лечения;

4. При определении боковых границ, площади деструкции и линии резекции при органосохраняющих эндоскопических манипуляциях следует ориентироваться на эндомикроскопические критерии здоровой ткани, уточняющие эндоскопические признаки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коломацкая П.Б. Пищевод Барретта. Эпидемиология, экология, патогенез, морфологическая характеристика, возможности эндоскопической диагностики// Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии, 2011 (URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/kolomats_v11.htm).
2. Солодкий В.А., Синев Ю.В., Иванова О.В., Грунин И.Б., Коломацкая П.Б. Конфокальная лазерная эндомикроскопия в диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта// Вестник РГМУ. -2012. - № 6. – С.17 – 20.
3. Солодкий В.А., Синев Ю.В., Иванова О.В., Грунин И.Б., Коломацкая П.Б. Возможности конфокальной лазерной эндомикроскопии в диагностике пищевода Барретта// Российский медицинский журнал. – 2013. - № 1. – С.33-36.

Сокращения

АКП - Аденокарцинома пищевода

ГЭРБ - Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

ЖКТ - Желудочно-кишечный тракт

КЛЭМ - Конфокальная лазерная эндомикроскопия

ПБ - Пищевод Барретта

СО - Слизистая оболочка

ЭГДС - Эзофагогастродуоденоскопия

