

© Н.Н. ПАВЛОВА

Консультативно-диагностический центр (г.Тюмень)
Pavlova_natali@inbox.ru

УДК 611.345.616 – 006.6 – 0.72.1

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ — НОВЫЙ ШАГ В КАНЦЕРОПРЕВЕНЦИИ

CONFOCAL LASER ENDOMICROSCOPY AS A NEW STEP IN CARCINOMA PREVENTION

АННОТАЦИЯ. В статье рассматриваются клинические случаи диагностики заболеваний органов желудочно-кишечного тракта при использовании конфокальной лазерной эндомикроскопии (КЛЭМ). Автор статьи разделяет мнение практикующих врачей о том, что новая инвазивная методика позволяет во время выполнения стандартной эндоскопической процедуры *in vivo* в режиме реального времени получать изображения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта в высоком разрешении. Автор отмечает, что использование конфокальной лазерной эндомикроскопии расширяет диагностические возможности. КЛЭМ не повреждает слизистую оболочку и позволяет наблюдать за ее состоянием в динамике. Главное преимущество КЛЭМ в быстрой постановке точного диагноза и возможности безотлагательно приступить к рациональному лечению.

SUMMARY. The given work deals with the description of clinical cases of diagnostics of gastrointestinal tract diseases using a confocal laser endomicroscopy (CLEM). The author shares the view of practitioners that this new noninvasive technique allows during the standard endoscopic procedure *in vivo* in real time to obtain images of the mucosa of the gastrointestinal tract in high resolution [the so-called virtual biopsy]. The author believes that the use of confocal laser endomicroscopy expands diagnostic capabilities. CLEM does not damage the mucosa and allows to monitor its status over time. The main CLEM advantage is fast diagnosis and an opportunity to begin early treatment.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Конфокальная лазерная эндомикроскопия, предраковые заболевания органов желудочно-кишечного тракта, неинвазивная технология.

KEY WORDS. Confocal laser endomicroscopy, precancerous lesion of the gastrointestinal tract, noninvasive technique.

Хромозэндоскопия, увеличительная зумм-эндоскопия, эндоскопия высокой четкости, узкоспектральная эндоскопия заметно улучшили детальную оценку мельчайших патологических изменений слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (СО ЖКТ) [1]. При этом выполнение прицельных биопсий с последующим морфологическим исследованием биоптатов остается необходимым условием для постановки диагноза. Однако выполнение множественных биопсий или эндоскопических резекций сопряжено с известными осложнениями. К ним относятся как потенциальные осложнения (кровотечения, перфорации), так и частые ложноотрицательные результаты вследствие взятия нерепрезентативных биопсий, что требует проведения повторных и дополнительных исследований [2]. Это, вместе с дорогостоящим, трудоемким, многоступенчатым процессом изготовления гистологических препаратов, приводит к значительным временным и материальным затратам.

В настоящее время медицина сделала значительный шаг вперед, получив в руки методики, позволяющие оценивать слизистую оболочку *in vivo* на клеточном уровне [3]. Сегодня на рынке присутствует два прибора. Первый — это прибор компании Пентакс, где конфокальный датчик встроен непосредственно в эндоскоп. Второй — система Сельвизио, где датчик находится в автономном зонде, который проводится к исследуемому образцу ткани через “рабочий канал” обычного эндоскопа [4].

Методика проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии выполняется под внутривенным введением флуоресцентного вещества 10% флуоресцеина натрия, который через 20 секунд дает полноценное высококонтрастное конфокальное изображение, длящееся 20 минут. Контраст через капиллярные стенки поступает в межклеточное пространство, окрашивая его, а также клетки поверхностного эпителия и собственную пластинку слизистой оболочки, что позволяет получать в режиме реального времени *in vivo* гистологическое исследование. Это дает возможность идентифицировать эпителиоциты, капилляры (белесоватые поля флуоресценции в просвете сосудов), эритроциты, межклеточное вещество, полоски базальной мембраны, наличие воспалительной инфильтрации и увидеть очень похожее изображение на гистологическое. Ядра клеток не окрашиваются флуоресцеином и на конфокальных изображениях визуализируются в виде темных пятен. Конфокальная эндомикроскопия позволяет провести быструю дифференцировку между неизменной нормальной слизистой оболочкой и слизистой с регенеративными и опухолевыми изменениями [5].

Для создания конфокального изображения луч лазера определенной длины волны и низкой мощности (аргон-ионный лазер синего света, волна возбуждения 488 нм) наводится на исследуемый участок слизистой оболочки через объектив с использованием так называемого селективного зеркала. Специальное многослойное напыление из диэлектрических материалов обеспечивает высокоэффективное отражение света на длине волны генерации лазера и почти 100% пропускание света в остальном спектральном диапазоне. На образце ткани лазер освещает не все поля зрения, а фокусируется в точку. Предварительно введенные флуоресцентные вещества возбуждаются светом лазера и дают свечение, собираемое тем же объективом. Селективное зеркало отражает рассеянный образцом лазерный свет, пропуская через себя к системе детекции (фото-

электронный умножитель, ФЭУ) флюоресцентное излучение, очищенное от паразитного светорассеяния. Для улучшения разрешения используется конфокальная диафрагма (конфокальная апертура, «pinhole»), которая помещается в той плоскости, где микроскоп фокусирует флюоресценцию, собранную из фокуса объектива [6].

При нормальной слизистой оболочке конфокальная эндомикроскопия (КЭМ) показывает регулярно расположенные сосочки, ядра клеток имеют одинаково ровные размеры, расположены в ряд, не увеличены, не деформированы.

При кишечной метаплазии (факультативный предрак) пациентам проводится КЭМ с целью сканирования участков с диспластическими изменениями. Визуализируются регулярно расположенные сосочки, однако они более плотно расположены, их количество увеличено, как при гиперплазии, и видны темные бокаловидные клетки, они содержат муцинозный пигмент, который не накапливает флюоресцеин, и поэтому они темные, а эпителиоциты кишечного типа более вытянуты, чем желудочные.

При кишечной метаплазии слизистой оболочки с дисплазией (о множественные бокаловидные клетки вытянутой формы, кишечные эпителиоциты,): ядра клеток становятся веретенообразными, хотя полярность клеток сохранена, имеется псевдомногорядность.

Модель классификации (*pit pattern раннего рака*) S. Kudo (1994) [7]: с помощью конфокальной эндомикроскопии выглядит следующим образом:

Тип А — круглые ямки с круглым просветом. Это норма СО: так выглядят в норме фундальные железы на КЭМ.

Тип В — непрерывные короткие палочкообразные ямки с щелевидным просветом. Так выглядит СО тела желудка с хроническим воспалением.

Тип С — короткие ямки с ромбовидным просветом. Это изображение слизистой оболочки пилорического отдела в норме.

Тип Д — удлиненные извилистые ветвеподобные ямки, характерные для СО антрального отдела с хроническим воспалением.

Тип Е — количество ямок уменьшается, и они заметно расширяются, что характерно для хронического атрофического гастрита.

Тип F — ворсиноподобные ямки с интерстицией в центре и появляющиеся бокаловидные клетки. Характерная картина кишечной метаплазии СО.

Тип G — исчезновение нормальных ямок с появлением атипичных клеток диффузно. Картина характерна для различной степени дифференцировки аденокарциномы.

Приведем несколько клинических примеров выявления заболеваний с использованием уточняющей диагностики КЛЭМ.

Пациент К., 70 лет, с длительно текущей ГЭРБ (гастроэзофагиальной рефлюксной болезнью) был направлен на скрининговое обследование. При проведении стандартной эндоскопии и взятии четырехквдратной биопсии с интервалом в 1-2 см по гистологии был верифицирован пищевод Барретта (ПБ). Метод случайного взятия биопсии имеет высокую вероятность ошибки выборки. В данном случае на 26 см от резцов по передней полуокружности в пределах пищевода Барретта визуализировалась плоская зона с отсутствием регулярной архитектоники, размерами до 1 см. У данного пациента имелись участки добро-

качественного ПБ. Уточняющая диагностика позволила увидеть четкую разницу между предыдущими доброкачественными изменениями и появлением патологического участка, где обнаружили темного цвета расширенные поля вновь образованных патологических нерегулярных сосудов, определяются вытянутой формы железы с регулярно расположенными эпителиоцитами. В центре данной зоны ядра эпителиоцитов увеличены, потеряли полярность, расположены хаотично. Здесь была диагностирована высокая степень дисплазии с внутрислизистым раком (рис. 1).

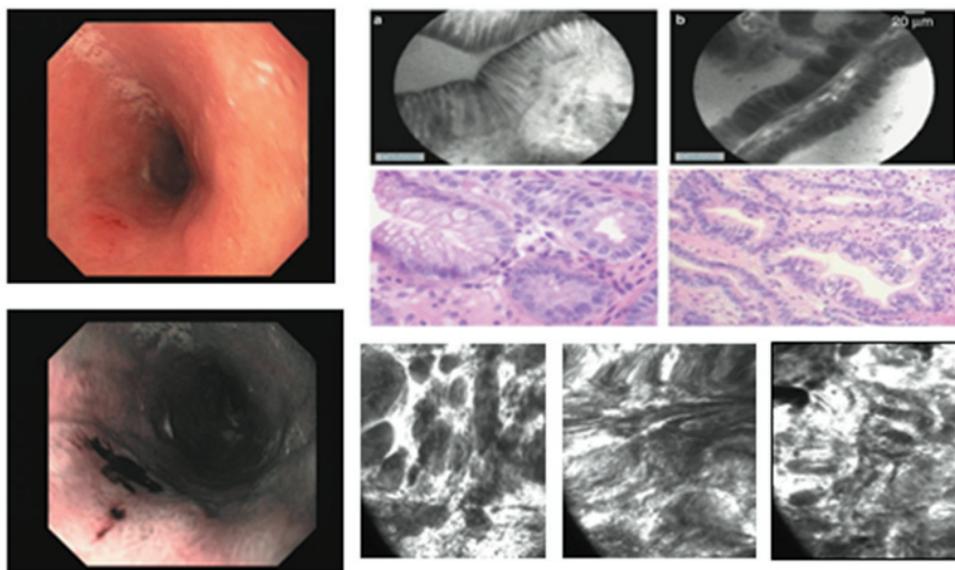


Рис. 1. Высокодифференцированная аденокарцинома на фоне пищевода Барретта (пациент К., 70 лет)

У пациента Е., 54 года, выявлен язвенно-инфильтративный рак в верхней трети тела желудка с переходом на розетку кардии. Очаг СО в препилорическом отделе подозрителен в отношении второй опухоли желудка, для исключения которого было рекомендовано проведение конфокального эндомикроскопического исследования. При этом исследовании выявлено, что в данной зоне отмечается выраженная гиперплазия СО, заключающаяся в увеличении количества и плотном расположении сосочков. Ближе к образованию отмечалась кишечная метаплазия эпителия, что проявляется наличием эпителиоцитов кишечного типа, удлинённых с вытянутыми ядрами и бокаловидных клеток. По краям образования визуализировались железы древовидной формы. Ядра клеток становятся веретенообразными, хотя полярность клеток сохранена, имеется псевдомногообразие, что подтверждается данными морфологического исследования. Достоверных признаков наличия фокусов аденокарциномы не выявлено (рис. 2).

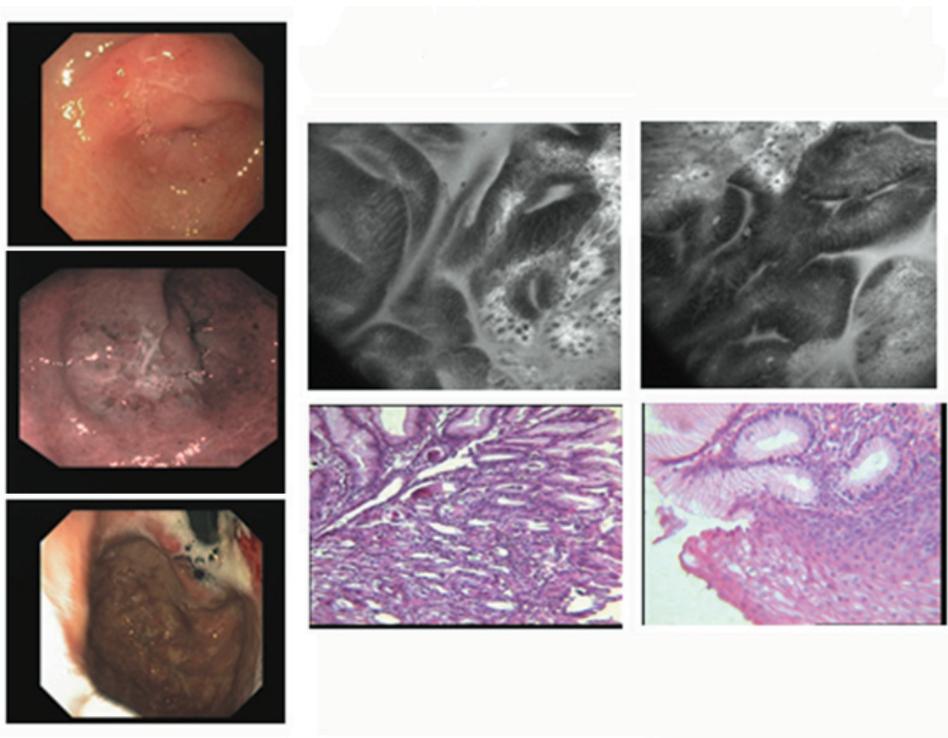


Рис. 2. Аденома с умеренной дисплазией эпителия на фоне хронического гастрита с гиперплазией кишечной метаплазией СО препилорического отдела желудка (пациент Е., 54 г.)

У пациента К., 66 лет, в области угла желудка по малой кривизне визуализирована плоская зона размерами до 1,8 см с выраженной виллезной и участками нерегулярной архитектоники (при осмотре в режиме узкого спектра света — NBI). Произведено КЛЭМ-исследование. В данной зоне визуализированы аденоматозные структуры (железы) с вытянутыми эпителиоцитами, их выстилающими, без бокаловидных клеток, ядра эпителиоцитов также вытянуты, однако расположены в ряд. Потери полярности, псевдомногорядности не отмечается. Ядра эпителиоцитов одного размера. Отмечено два участка не более 20х20 микрон, где ядра клеток потеряли полярность, скучены. Кроме того, отмечена выраженная лимфоплазмоцитарная инфильтрация.

У пациентки Ч., 60 лет, впервые на фоне атрофии оболочки в верхней, средней и нижней третях тела желудка были визуализированы плоские и незначительно возвышающиеся участки СОЖ с точечной архитектоникой, часть из них с патологически извитыми сосудами, размерами от 2 до 5мм. По морфологическому исследованию в биоптате СО определены железы, выстланные высоким слизеобразующим эпителием покровно-язочного типа с выраженным дистрофическим ослизнением, с образованием бокаловидных клеток, по структуре напоминающих перстневидные, с явлениями типа погружения клеток в строму, хотя опухолевой трансформации желез и отчетливой ядерной атипии нет. При проведении КЛЭМ визуализируются сходные с морфологией клетки.

Заключение: картина множественных нейроэндокринных опухолей (карциноидов) 1 типа и участков эндокринной гиперплазии СОЖ на фоне аутоиммунного атрофического гастрита с гиперпластическим воспалительным компонентом.

Клинический случай пациентки О., 66 лет, с длительно не рубцующейся язвой желудка. В данном случае биопсия выполнялась в соответствии со стандартным протоколом, хотя никаких подозрений в отношении онкологии не было выявлено. Тем не менее, именно при конфокальной эндомикроскопии визуализируются уже железистые структуры, еще сохранены регулярно расположенные сосочки, но есть зоны, где отмечается скученность, гиперхромия и полиморфизм ядер эпителиоцитов с единичными митозами, дисплазия умеренной и тяжелой степени, при взятии прицельной биопсии с данных зон. Картина соответствовала язве желудка с обострением и малигнизацией в крае (рис. 3).

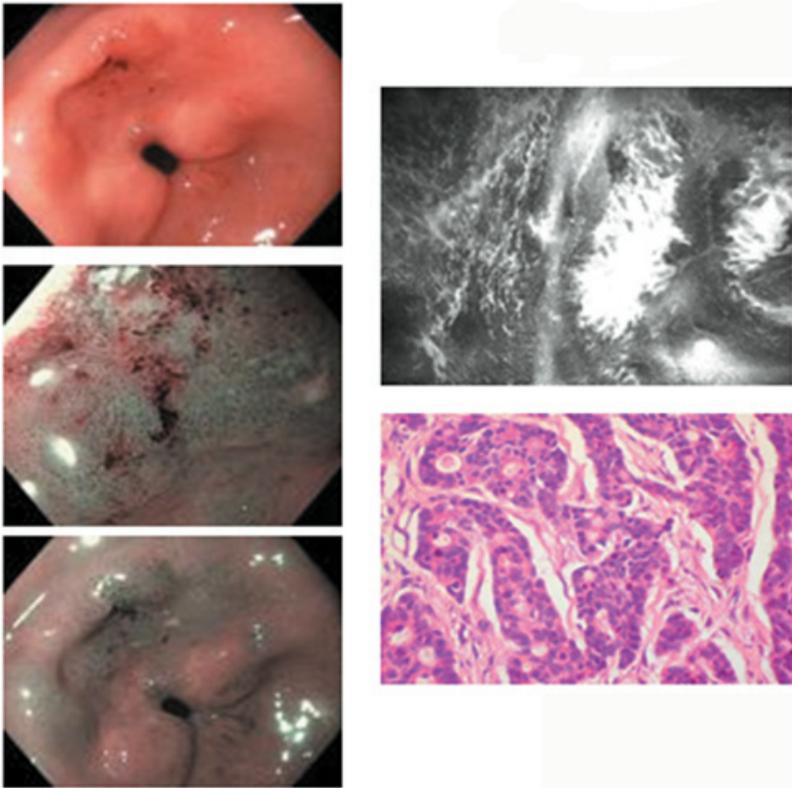


Рис. 3. Малигнизация в крае хронической язвы тела желудка (пациентка О., 66 лет)

Идентичный случай малигнизации в крае длительно не рубцующейся хронической эрозии у пациентки В., 62 лет. После неоднократных биопсий в течение года верифицировался хронический атрофически-гиперпластический гастрит с формированием эрозий, полипозно измененная слизистая с кишечной метаплазией. Проведенная КЭМ выявила наличие фокусов тяжелой дисплазии в крае и дне хронической эрозии, ядерную атипию. По произведенной биопсии морфологи верифицировали единичные атипические митозы, крайне подозрительные на малигнизацию. Пациентка направлена в онкодиспансер (рис. 4).

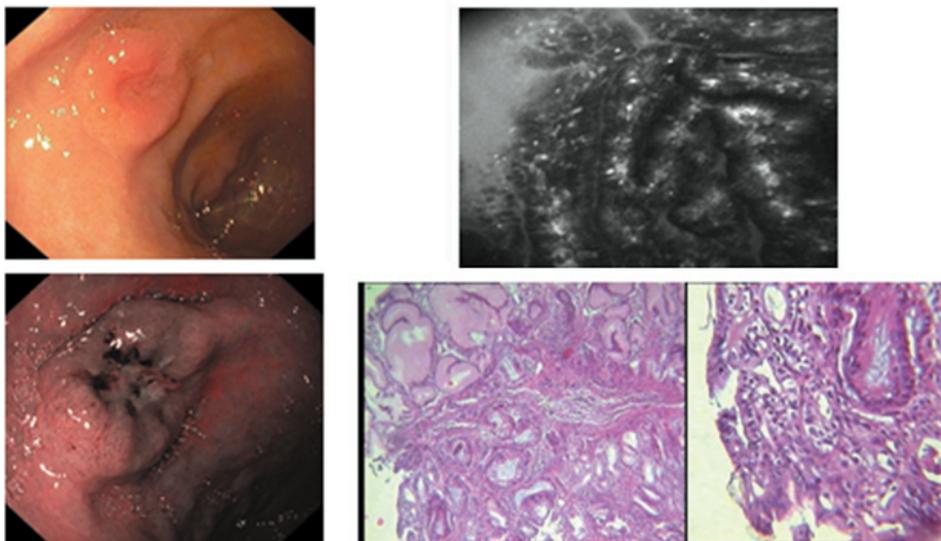


Рис. 4. Малигнизация в крае хронической эрозии (пациентка В., 62 г.)

У пациентки Д., 62 лет, плоско возвышающийся ранний рак, располагающийся в пределах слизистой оболочки по данным эндосонографии. При КЛЭМ визуализированы разрушения железистых структур, уродливые, потерявшие полярность ядра эпителиоцитов, организующие скопления: высокодифференцированная аденокарцинома. Клетки представлены только ядром, цитоплазмы как таковой не визуализируется.

К методам оптической биопсии при раннем раке желудка относится КЛЭМ, представляющая собой виртуальную гистологию, позволяющая на ранней стадии выявить неоплазию, наблюдать за предраковыми состояниями в динамике, осуществляя канцеропревенцию [8]. В настоящее время в нашем отделении проведено 28 исследований у больных с предраком и раком желудка. Их точность составила 95%. Результаты, в первую очередь, зависят от подготовки специалиста. Точность первых 12 исследований была значительно ниже, в реальности выявленные дисплазии носили реактивный характер. Точность последних 16 составила 100%.

Преимущества конфокальной лазерной эндомикроскопии:

- раннее, более эффективное выявление опухоли на излечимой стадии как обещающая стратегия для сокращения смертности от опухолей;
- уменьшение количества обычной биопсии, благодаря «умной биопсии»;
- оптимизация процесса работы в эндоскопии: возможность принимать терапевтические решения на месте (наличие рабочего канала для манипуляций);
- эффективное использование новых специфических терапевтических мер (микроскопический/молекулярный мониторинг эффективности) — морфология *in vivo*.

Таким образом, мы имеем в руках оптическую гистологию. Поскольку в пределах одной опухоли имеется различная степень выраженности аденокарциномы, дисплазии низкой и высокой степени, очень важно место забора биоп-

сийного материала. Мы можем просканировать всю поверхность опухоли и СО, выбрав наиболее точное место для взятия биопсии. КЛЭМ позволяет визуализировать слизистую оболочку на тканевом уровне, видеть все клеточные элементы, проводить оптические срезы и виртуальную гистологию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлова Н.Н, Соловьев В.С. Опухоли толстой кишки: эндоскопическая диагностика // Вестник Тюменского государственного университета. 2013. № 6. Серия «Медико-биологические науки». С. 123-131.
2. Павлова Н.Н. Стандарты диагностической эндоскопии верхних отделов пищеварительного тракта: возможные пути решения // Вестник Тюменского государственного университета. 2011. № 6. Серия «Медико-биологические науки». С. 193-196.
3. Павлова Н.Н. Проблемы диагностики рака желудка (обзор современной медицинской литературы) // Homo Legens / Человек читающий: компаративный подход к проблемам современного образования. Тюмень, 2012. С. 170-179.
4. Солодкий В.А., Синева Ю.В., Иванова О.В. и др. Конфокальная лазерная эндомикроскопия в диагностике заболеваний органов желудочно-кишечного тракта // Вестник РГМУ. 2012. № 6. С. 17-20.
5. Palma, G.-P. Confocal Laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of gastrointestinal tract // World J Gastroenterol. 2009. V. 15 (46). Pp. 5770-5775.
6. Kitabatake, S. Niva, Y., Miyahara, R. et al. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo // Endoscopy. 2006. V. 38 (11). Pp. 1110-1114.
7. Kiesslich, R., Galler, R., Neurath, M. et al. Atlas of Endomicroscopy: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008. 103 p.
8. Kiesslich, R., Goetz, M., Neurath M. Confocal Laser endomicroscopy for gastrointestinal diseases // Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. 2008. V. 18. Pp. 451-466.
9. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. 2007. Т. 47.
10. Соловьева С.В. Интегративные механизмы адаптации новопоселенцев Севера. Саарбрюккен, 2011. 299 с.

REFERENCES

1. Pavlova, N.N, Solov'ev, V.S. Colon tumors: endoscopic diagnosis. *Vestnik Tiimenskogo gosudarstvennogo universiteta — Tyumen State University Herald*. 2013. № 6. Series «Medical-biological sciences». Pp. 123-131 (in Russian).
2. Pavlova, N.N. Standards of Diagnostic Endoscopy of the Upper Gastrointestinal: Possible Solutions. *Vestnik Tiimenskogo gosudarstvennogo universiteta — Tyumen State University Herald*. 2011. № 6. Series «Medical-biological sciences». Pp. 193-196 (in Russian).
3. Pavlova, N.N. Problems of Gastric Cancer Diagnosis (Review of Contemporary Medical Literature) // *Chelovek Chitaiushchii [Homo Legens]*. Tyumen, 2012. Pp. 170-179. (in Russian).
4. Solodkii, V.A., Sinev, Iu.V., Ivanova, O.V. et al. Confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of gastrointestinal diseases. *Vestnik RGMU — Bulletin of RSMU*. 2012. № 6. Pp. 17-20. (in Russian).
5. Palma, G.-P. Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 2009. V. 15 (46). Pp. 5770-5775.
6. Kitabatake, S. Niva, Y., Miyahara, R. et al. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy*. 2006. V. 38 (11). Pp. 1110-1114.
7. Kiesslich, R., Galler, R., Neurath, M. et al. Atlas of Endomicroscopy: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008. 103 p.

8. Kiesslich, R., Goetz, M., Neurath M. Confocal laser endomicroscopy for gastrointestinal diseases. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2008. V. 18. Pp. 451-466.

9. Feofanov, A.V. Spectral laser scanning confocal microscopy in biological research. *Uspekhi biologicheskoi khimii — Successes of biological chemistry.* 2007. № 47. Pp. 371-410. (in Russian).

10. Solov'eva, S.V. *Integrativnye mekhanizmy adaptatsii novoposelentsev Severa* [Integrative adaptation mechanisms of new residents of the northern regions]. Saarbrücken, 2011. 299 p. (in Russian).

Автор публикации

Павлова Наталия Николаевна — врач-эндоскопист, гастроэнтеролог Консультативно-диагностического центра (г. Тюмень), кандидат медицинских наук, доцент

Author of the publication

Nataliya N. Pavlova — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Endoscopist, Gastroenterologist, Tyumen Regional Autonomous Public Health Agency "Consultative Diagnostic Center"