



КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПИЩЕВОДА БАРРЕТТА

Щербаков П. Л., Хомерики С. Г., Кирова М. В.

ГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии ДЗ г. Москвы

Кирова Марина Владимировна

111123, Москва, шоссе Энтузиастов, д. 86

E-mail: kirmavl@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

Пищевод Барретта (ПБ) известен как потенциально предраковое заболевание пищевода, которое может быть диагностировано по наличию специализированного цилиндрического эпителия с бокаловидными клетками. Однако гистологическое исследование влечет за собой определенные временные затраты. Более того, специализированный цилиндрический эпителий присутствует как мозаичная вставка в нижней трети пищевода и может быть пропущен при проведении «случайных» биопсий. Конфокальная лазерная эндомикроскопия позволяет установить диагноз непосредственно во время традиционного эндоскопического исследования благодаря визуализации структуры слизистой оболочки *in vivo*.

Ключевые слова: ПБ; конфокальная лазерная эндомикроскопия; диагностика *in vivo*.

SUMMARY

Barrett's esophagus (BE) is known as a precursor of esophageal carcinoma, which can be defined by the presence of specialized columnar epithelium with goblet cells. Histological evaluation of biopsy specimens is time-consuming. Moreover specialized columnar epithelium is often present in a mosaic insertion within columnar-lined lower esophagus and can be missed by random biopsies. Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) allows *in vivo* visualization of mucosal structure and rapid diagnosis during conventional endoscopy.

Keywords: BE; confocal laser endomicroscopy; diagnosis *in vivo*.

В 1950 году английский хирург Norman Barrett обратил внимание исследователей на наличие цилиндрического эпителия в терминальном отделе пищевода рядом с пептическими язвами пищевода. Позднее данное состояние получило название ПБ, прочно укоренившееся в отечественной и зарубежной литературе и обозначающее потенциально предраковое заболевание пищевода с многоэтапной неопластической прогрессией и плохим прогнозом аденокарциномы на его фоне.

Однако длительное время в мировой литературе не было единой точки зрения на то, что же относить к ПБ. Разные авторы описывали значительно различающиеся виды цилиндрического эпителия в терминальном отделе пищевода. Позднее было доказано, что при гистологическом исследовании

в зоне ПБ выявляются три типа железистого эпителия: эпителий фундального отдела желудка, эпителий кардиального отдела (переходного типа) и специализированный цилиндрический эпителий с бокаловидными клетками. При этом только выявление в пищеводе специализированного цилиндрического эпителия (кишечная метаплазия неполного типа) позволяет установить диагноз ПБ; если при гистологическом исследовании определяются только клетки фундального или кардиального типов, следует говорить лишь о желудочной метаплазии пищевода, а не о ПБ, так как эти клетки не несут в себе риска возникновения аденокарциномы.

По сравнению с общей популяцией риск развития аденокарциномы при ПБ увеличивается в 20–60 раз [1]. Однако нет убедительных данных

о повышении уровня смертности больных с ПБ, так как развитие аденокарциномы пищевода встречается относительно редко даже у этой категории больных [2].

Solaymani-Doradan и соавт. исследовали данные 27813 больных и выявили, что уровень смертности в группах больных с ПБ, рефлюкс-эзофагитом и гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) без эзофагита составил 42, 37 и 37 на 1000 больных в год соответственно [3].

Nage и соавт. сообщают о 105 пациентах с длинным сегментом ПБ (средняя длина 7,1 см). За 11-летний период развитие аденокарциномы пищевода было выявлено у 6 из них (6%), дисплазии высокой степени — у 5 (5%). Из данных 11 больных в течение периода наблюдения умерло 9 больных, из них у четырех доказанной причиной смерти послужил рак пищевода (остальные вовремя не проходили повторные эндоскопические исследования) [4].

ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

До настоящего времени своевременная диагностика ПБ в силу различных причин нередко представляет значительные трудности. У 25% больных с ПБ отсутствует специфическая клиническая симптоматика. Отмечено, что цилиндрический эпителий в пищеводе не только сам по себе не вызывает симптомов, но даже, наоборот, является менее чувствительным к боли, чем природный многослойный плоский эпителий пищевода. Клинические проявления болезни обусловлены не ПБ, а ГЭРБ, выраженность которой может быть различной. Терапия, направленная на купирование симптомов ГЭРБ, часто оказывается эффективной и устраняет симптомы заболевания, однако морфологические признаки ПБ сохраняются.

Долгое время «золотым стандартом» диагностики ПБ являлось эндоскопическое исследование метаплазированного сегмента дистального отдела пищевода с выполнением четырехквadrантных «слепых» биопсий на протяжении каждого сантиметра по длине сегмента.

В последние годы качество эндоскопических изображений постоянно улучшается благодаря появлению новых высокочувствительных технологий, позволивших увеличить и оптимизировать диагностическую точность проводимых процедур. Эндоскопия с высоким разрешением, узкоспектральная и хромоэндоскопия позволили осуществлять прицельные биопсии наиболее подозрительных участков метаплазированного эпителия, что обеспечило современной эндоскопической диагностике большой шаг вперед. Однако при использовании данных методик окончательный диагноз продолжает основываться на результатах морфологического исследования, что обуславливает значительные временные затраты на фиксацию препарата, изготовление срезов и окрашивание. Кроме того, нередко кусочки ткани, взятые для гистологического исследования, не содержат важного для постановки

диагноза фрагмента ткани, что связано с неравномерностью распределения участков кишечной метаплазии в сегменте метаплазированного эпителия.

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ

Принципиально новым направлением эндоскопической диагностики, позволяющим осуществлять постановку точного диагноза непосредственно во время проведения исследования, является конфокальная лазерная эндомикроскопия, позволяющая исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности. Техника представляет собой мост между эндоскопией и гистологией и дает возможность получать «прижизненные» гистологические изображения слизистой оболочки («виртуальная биопсия») [5; 6].

Принципы конфокальной микроскопии были заложены в США еще в конце 1950-х годов профессором М. Minsky. Если с помощью классического микроскопа попытаться рассмотреть интактную ткань, любая исследуемая структурная единица окажется размытой бликами от над- и подлежащих тканей. Предложенная Minsky точечная диафрагма (апертура, пинхол) пропускает только излучение от точечной области узкого слоя, лежащего в фокальной плоскости микроскопа и ограничивает поток фонового рассеянного света, что обеспечивает высокий контраст получаемых изображений. Таким образом, конфокальный микроскоп создает четкое изображение образца, которое при использовании обычного микроскопа представляется размытым.

Однако в силу ряда обстоятельств только в 1990-х годах стало возможным представить конфокальный микроскоп как медицинскую систему визуализации. В 1994 году Delaney и соавт. впервые создали оптоволоконный конфокальный микроскоп [7]. В последующие годы активно разрабатывались способы его миниатюризации, результатом чего явилось создание нескольких поколений прогрессивно уменьшающихся в размерах оптоволоконных конфокальных микроскопов, в числе которых приборы для исследования кожи *in vivo*, ригидные конфокальные артроскопы и кольпоскопы.

В 2000 году Inoue и соавт. впервые применили конфокальный эндомикроскоп *ex vivo* для оценки нативных фрагментов слизистой оболочки пищевода, желудка и кишечника человека [8]. Эти первые данные продемонстрировали возможность получения изображений клеточных структур интактных тканей, однако качество и разрешающая способность изображений оказались довольно низкими.

Годом позже Koenig и соавт. показали эффективность применения во время исследования флуоресцентного красителя, что привело к впечатляющему увеличению разрешающей способности получаемых изображений [9]. Теперь границы между клетками и отдельные ядра без труда могли быть идентифицированы, а изображения, получаемые с неизменной

слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, были практически идентичны стандартным морфологическим препаратам, окрашенным гематоксилином и эозином. Однако первоначально применявшиеся красители не могли быть использованы *in vivo* из-за их высокой токсичности и мутагенности; кроме того, процесс окрашивания длился около двух часов. В последующие годы проводились исследования других красителей, наиболее приемлемыми из которых оказались вводимый внутривенно флуоресцеин натрия 10% [10] и применяемые местно акрифлавин 0,2% и крезилвиолет 2% [11].

КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

В первом эндомикроскопическом исследовании ПБ у 63 пациентов в 2006 году Kiesslich и соавт. выявили, что ПБ и ассоциированная неоплазия могут быть диагностированы с чувствительностью 98,1 и 92,9% соответственно, специфичностью 94,1 и 98,4% соответственно [12]. Исследования последующих лет позволили подтвердить эффективность методики, выявили ряд дополнительных данных по изменениям сосудистой и клеточной архитектоники в пищеводе Барретта, а также доказали отсутствие необходимости в проведении биопсии при отсутствии признаков неопластических изменений [13].

В ЦНИИГ проводится обследование больных ПБ с использованием конфокальной лазерной эндомикроскопической системы *Cellvizio* (*Mauna Kea Technologies*, Франция) (рис. 1). К основным компонентам системы относятся конфокальный лазерный сканирующий блок, находящийся за пределами тела больного, и вводимые через инструментальный канал эндоскопа конфокальные мини-зонды различных моделей и типов в зависимости от предназначения и их оптических свойств, которые передают сканирующий лазерный луч в зону наблюдения и фиксируют флуоресцентный свет, отражаемый тканью (рис. 2, см. на цветной вклейке рис. 3).

Перед процедурой больному внутривенно вводится 2,5–5 мл 10%-ного раствора флуоресцеина натрия. После проведения стандартного эндоскопического исследования мини-зонд *GastroFlex™* или *GastroFlex™UHD* проводится через рабочий канал эндоскопа до легкого контакта со слизистой оболочкой пищевода в зоне интереса. За считанные секунды распределяющийся по капиллярному руслу флуоресцеин позволяет хорошо визуализировать микрососуды, клетки и соединительнотканые структуры, однако ядра клеток и слизь остаются неокрашенными, а потому недостаточно видны на конфокальных изображениях и выглядят темными. Получаемые на экране монитора *Cellvizio* видеозаписи и отдельные изображения микрососудистой структуры и структуры эпителия сохраняются в цифровом виде, что в последующем дает возможность проводить ретроспективный уточняющий анализ полученных данных.

В норме структура слизистой оболочки пищевода представлена многослойным плоским неороговевающим эпителием, отделенным базальной мембраной от подлежащей собственной пластинки слизистой оболочки, которая вдается в эпителий, образуя содержащие капиллярную сеть сосочки (рис. 4 см. на цветной вклейке).

Конфокальные эндомикроскопические изображения существенно отличаются от традиционных гистологических препаратов, так как имеют не продольную, а горизонтальную ориентацию срезов. На получаемых во время эндомикроскопической процедуры изображениях в норме слизистая оболочка пищевода имеет едва различимую сетчатую структуру с хорошо видимой капиллярной сетью сосочков (рис. 5). При наличии воспа-

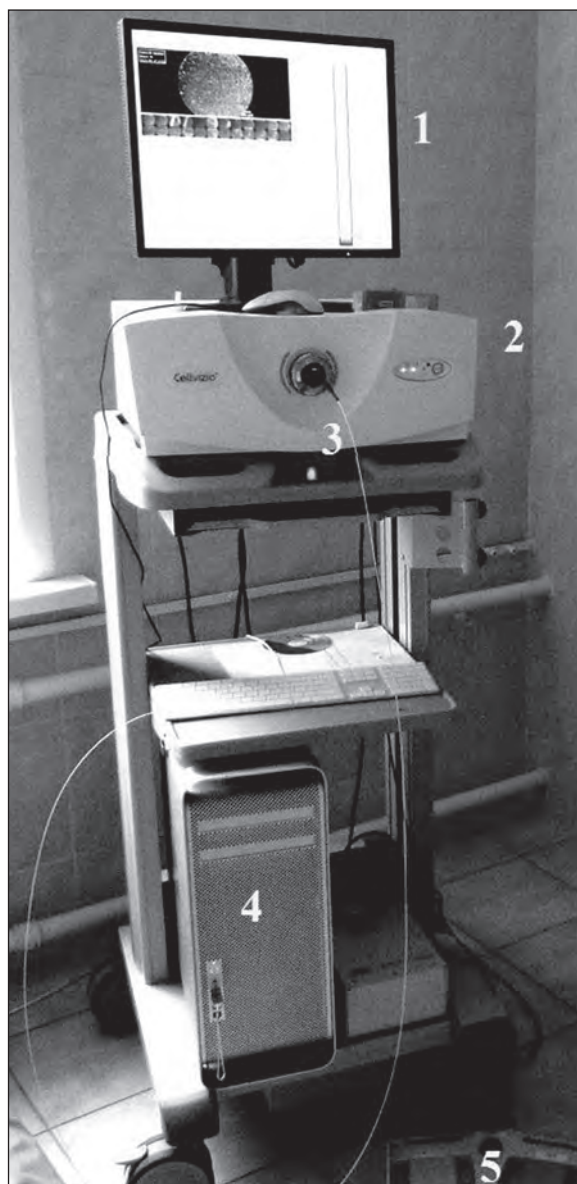


Рис. 1. Конфокальная лазерная эндомикроскопическая система *Cellvizio*: 1 — монитор; 2 — лазерный сканирующий блок; 3 — мини-зонд; 4 — системный блок; 5 — педали управления показом и записью изображений



Рис. 2. Проведение мини-зонда через рабочий канал эндоскопа

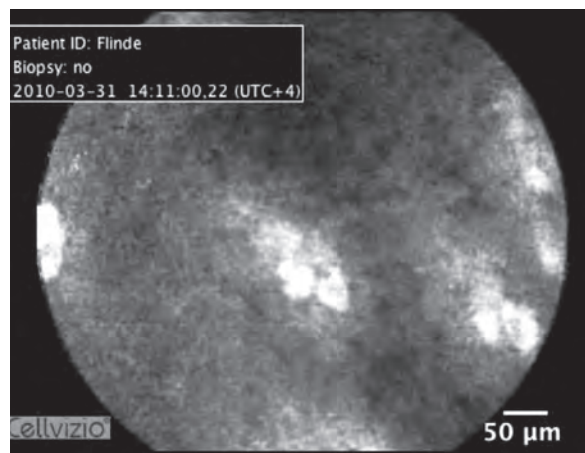


Рис. 5. Слизистая оболочка пищевода в норме

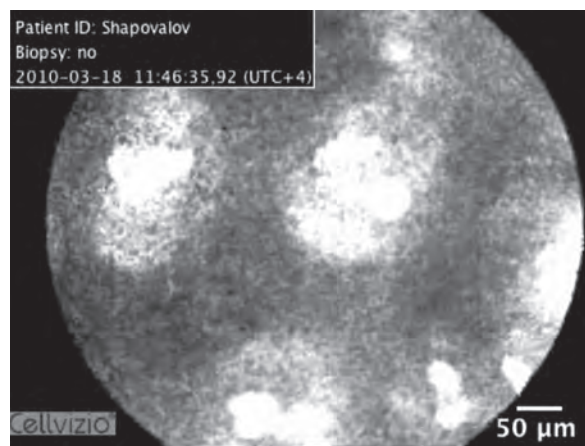


Рис. 6. Усиление сосудистого рисунка при эзофагите

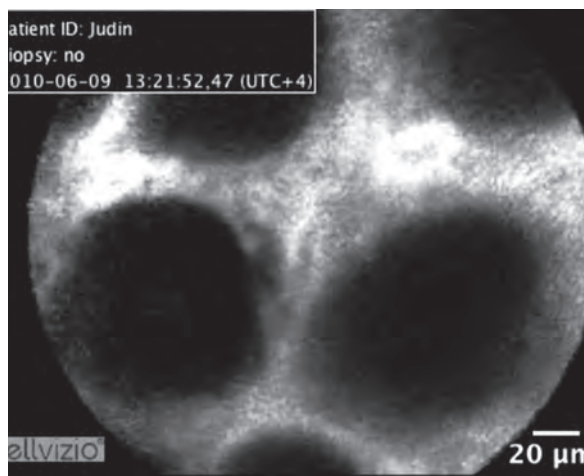


Рис. 8. Желудочная метаплазия в нижней трети пищевода

лительных изменений эпителия отмечается усиление сосудистого рисунка (рис. 6).

Длительное воздействие соляной кислоты и пепсина при ГЭРБ приводит к повреждению многослойного плоского эпителия пищевода и замещению его метаплазированным цилиндрическим эпителием. Конфокальная лазерная эндомикроскопия позволяет с высокой точностью дифференцировать характер метаплазированного эпителия в пищеводе

непосредственно во время проведения эндоскопической процедуры.

При наличии в пищеводе желудочной метаплазии на эндомикроскопических изображениях можно видеть множество попадающих в горизонтальный оптический срез желудочных ямок, куда открываются выводные протоки желез, и желудочных валиков с отчетливо видимой сосудистой сетью (рис. 7 см. на цветной вклейке, рис. 8).

Патогномоничная для ПБ слизистая оболочка нижней трети пищевода выстлана специализированным цилиндрическим эпителием с бокаловидными клетками (неполная кишечная метаплазия). Попадающие в оптический срез поперечные сечения крипт и желез создают легкоузнаваемую при проведении исследования картину, а содержащие слизь бокаловидные клетки выглядят темными и легко различимы на эндомикроскопических изображениях (рис. 9 см. на цветной вклейке, рис. 10, 11). Нерегулярность сосудистой сети и структуры эпителия, а также экстравазации флуоресцеина позволяет заподозрить дисплазию в ПБ [14].

В ЦНИИГ с марта по июль 2010 года обследовано 15 больных, у которых во время проведения предыдущих ЭГДС определялись эндоскопические признаки ПБ (12 мужчин и 3 женщины в возрасте от 40 до 76 лет, средний возраст $65,1 \pm 10,0$ года).

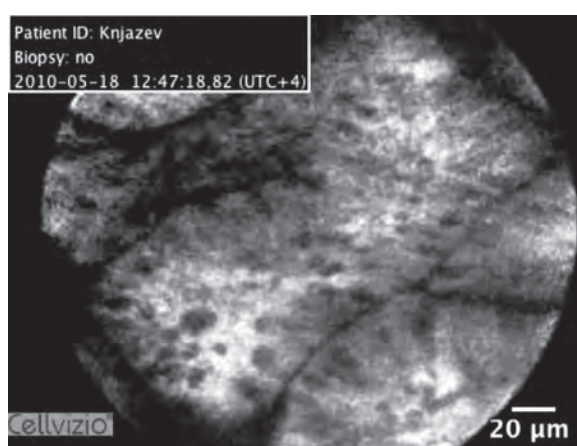


Рис. 10–11. Пищевод Барретта с множеством бокаловидных клеток, содержащих неокрашивающуюся флуоресцеином слизь

Средняя длина сегмента метаплазированного эпителия составила $2,9 \pm 1,0$ см. При проведении конфокальной лазерной эндомикроскопии у 5 больных (33,3%) был диагностирован ПБ, у 10 больных (66,7%) выявлялась желудочная метаплазия в области сегментарных подъемов в терминальном отделе пищевода. После окончания эндомикроскопического исследования проводилась стандартная четырехквadrантная биопсия (число биоптатов в среднем составило $3,2 \pm 1,1$). Последующее морфологическое исследование выявило присутствие специализированного цилиндрического эпителия с бокаловидными клетками у 6 больных (40%): в 5 случаях диагноз ПБ был установлен эндомикроскопически, у 1 больной во время исследования была диагностирована лишь желудочная метаплазия. У 9 больных (60%) при гистологической оценке фрагментов выявлялся эпителий пищевода

и желудка. Средний возраст больных с диагностированным ПБ составил $71 \pm 4,8$ года, средняя длина сегмента метаплазированного эпителия — $3,2 \pm 1,1$ см. В группе больных с желудочной метаплазией пищевода средний возраст составил $59,9 \pm 10,8$ года, длина метаплазированного сегмента — $2,7 \pm 1,0$ см. Средняя продолжительность исследования, включавшего стандартную ЭГДС с дополнительным использованием системы FICE, конфокальную лазерную эндомикроскопию и четырехквadrантную биопсию, составила $14,5 \pm 5,0$ минуты. Анализ полученных данных показал, что ПБ может быть диагностирован с помощью конфокальной лазерной эндомикроскопии с чувствительностью 83,3% и специфичностью 100%. Дальнейшие исследования необходимы для получения более точных данных о диагностической ценности нового метода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lagergren J. Adenocarcinoma of the esophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? // Gut. — 2005. — Vol. 54, Suppl. I. — P. 11 — 15.
2. Murray L., Watson P., Johnson B. et al. Risk of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: population based study // BMJ. — 2003. — Vol. 327. — P. 534 — 535.
3. Solaymani-Doradan M., Logan R., West J. et al. Mortality associated with Barrett's esophagus and gastroesophageal reflux disease diagnoses — a population-based cohort study // Am. J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 100. — P. 2616 — 2621.
4. Hage M., Siersema P. D., van Dekken H. et al. Oesophageal cancer incidence and mortality in patients with long-segment Barrett's oesophagus after a mean follow-up of 12.7 years // Scand. J. Gastroenterol. — 2004. — Vol. 39. — P. 1175 — 1179.
5. Wang T. D. Confocal microscopy from the bench to the bedside // Gastrointest. Endosc. — 2005. — Vol. 62. — P. 696 — 697.
6. Kiesslich R., Goetz M., Neurath M. F. Confocal laser endomicroscopy for gastrointestinal diseases // Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. — 2008. — Vol. 18. — P. 451 — 466, viii.
7. Delaney P. M., King R. G., Lambert J. R. et al. Fibre optic confocal imaging (FOCI) for subsurface microscopy of the colon *in vivo* // J. Anat. — 1994. — Vol. 184. — P. 157 — 160.
8. Inoue H., Igari T., Nishikage T. et al. A novel method of virtual histopathology using laser-scanning confocal microscopy *in-vitro* with untreated fresh specimens from the gastrointestinal mucosa // Endoscopy. — 2000. — Vol. 32, №6. — P. 439 — 443.
9. Koenig F., Knittel J., Stepp H. Diagnosing cancer *in vivo* // Sci. — 2001. — Vol. 292, №5520. — P. 1401 — 1403.
10. Becker V., von Delius S., Bajbouj M. et al. Intravenous application of fluorescein for confocal laser scanning microscopy: evaluation of contrast dynamics and image quality with increasing injection-to-imaging time // Gastrointest. Endosc. — 2008. — Vol. 68. — P. 319 — 323.
11. George M., Meining A. Cresyl violet as a fluorophore in confocal laser scanning microscopy for future *in-vivo* histopathology // Endoscopy. — 2003. — Vol. 35, №7. — P. 585 — 589.
12. Kiesslich R., Gossner L., Goetz M. et al. *In vivo* histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy // Clin. Gastroenterol. Hepatol. — 2006. — Vol. 4, №8. — P. 979 — 987.
13. Dunbar K. B., Okolo P. 3rd, Montgomery E. et al. Confocal laser endomicroscopy in Barrett's esophagus and endoscopically inapparent Barrett's neoplasia: a prospective, randomized, double-blind, controlled, crossover trial // Gastrointest. Endosc. — 2009. — Vol. 70. — P. 645 — 654.
14. Kiesslich R., Galle P., Neurath M. Atlas of Endomicroscopy. — 2008.