Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный Центр Здоровья Детей»

На правах рукописи

Шавров Антон Андреевич

«Конфокальная лазерная эндомикроскопия в диагностике болезней верхнего отдела пищеварительного тракта у детей»

14.01.19 Детская хирургия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
профессор, доктор медицинских наук,
Морозов Д.А.
Научный консультант:
доктор медицинских наук,
Волынец Г.В.

Москва
2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10

1.1. История развития систем для проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии. 10

1.2. Характеристики контрастных средств для Зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии 15

1.3 Методика проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии пищеварительного тракта и интерпретация полученных изображений 17

1.4. Клиническое применение конфокальной лазерной эндомикроскопии. 20

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 33

2.1. Характеристика клинического материала 33

2.2. Методы исследований 37

ГЛАВА 3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ ПРИ ВНУТРИПРОСВЕТНОМ ИССЛЕДОВАНИИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ 49

3.1. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки пищевода у детей 50

3.2. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки желудка у детей. 55

3.3. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка полипов пищеводно-желудочного перехода и желудка у детей. 58

3.4. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей. 61

3.5. Сравнительная оценка эндомикроскопических и гистологических методов исследования состояния слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей. 64

3.6. Зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия в оценке барьерной функции тонкой кишки у детей. 66

3.7. Результаты применения внутривенного флуоресцеина при оптической биопсии у детей 74

ГЛАВА 4. КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ В ОЦЕНКЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ У ДЕТЕЙ. 76
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 82
Направления будущих исследований 97
ВЫВОДЫ 99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 102
ЛИТЕРАТУРА 104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КЛЭМ – конфокальная лазерная эндомикроскопия

ЗКЛЭМ – зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия

ЭКЛЭМ – эндоскопическая конфокальная лазерная эндомикроскопия

ВОПТ – верхний отдел пищеварительного тракта

ГЭРБ – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

ПБ – пищевод Барретта

ЭЭ – эозинофильный эзофагит

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

БК – болезнь Крона

ЯК – язвенный колит

ФНО-α – фактор некроза опухоли α

ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Появление уточняющих методов диагностики и лечения приводит к изменению структуры заболеваемости, терапии и прогноза болезней органов пищеварения у детей. В их структуре ведущее место занимают воспалительные изменения слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки, выявляющиеся у каждого третьего ребенка [1,2]. Высокий уровень их распространенности, длительное нередко рецидивирующее течение с развитием тяжелых осложнений диктует необходимость раннего установления диагноза и назначения адекватной терапии.

Для ранней диагностики болезни необходима визуализация слизистой оболочки в деталях. Появление новых технологий внутрипросветных исследований, таких как узкоспектральная электронная хромоскопия и эндоскопия высокого разрешения в современных условиях наиболее высоко отвечает этим требованиям [2]. Однако все они в настоящее время не исключают необходимости взятия биопсийного материала для гистологического подтверждения диагноза болезни, оценке эффективности и объема и продолжительности медикаментозной терапии, определения необходимости хирургической коррекции осложнений и длительности последующего диспансерного наблюдения за больными. Широкий диапазон инвазивных мероприятий с многократным гистологическим исследованием фрагментов слизистой оболочки требует не только материальных затрат, но и продолжительного времени на их выполнение. В этой связи наибольшую актуальность приобретает совершенствование имеющихся и разработка новых безопасных для жизни больного ребенка диагностических мероприятий.

Последние технические достижения уменьшили конфокальный сканирующий микроскоп до размера, способного подводить его к слизистой оболочке через инструментальный канал обычного гибкого эндоскопа.

Методика конфокальной лазерной эндомикроскопии дает возможность в режиме реального времени получать гистологическое изображение слизистой оболочки или оптическую биопсию, что повышает существенный интерес в плане ранней диагностики и адекватной терапии.

Однако до настоящего времени значимость конфокальной эндомикроскопии в диагностике болезней верхнего отдела пищеварительного тракта у детей не определена, что обусловливает необходимость проведения исследований в этой области.

Цель исследования:

Дифференциальная диагностика и оценка эффективности лечения болезней верхнего отдела пищеварительного тракта у детей с применением зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии.

Задачи исследования:

1. Определить эндомикроскопические признаки структуры неизмененной слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей с помощью оптической биопсии.
2. Установить эндомикроскопические варианты структуры слизистой оболочки при патологии пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки у детей.
3. Сопоставить информативность зондовой конфокальной эндомикроскопии с гистологическим методом исследования фрагментов слизистой оболочки при болезнях верхнего отдела пищеварительного тракта у детей.
4. Оценить возможности зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии в диагностике изменений слизистой оболочки при различных формах патологии пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки у детей.
5. На основе данных зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии определить показания для мини инвазивных хирургических вмешательств и оценить их эффективность при осложненных формах гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у детей.
6. Определить эндомикроскопические признаки нарушения барьерной функции тонкой кишки у детей заболеваниями тонкого кишечника.

Научная новизна:

Установлены критерии структуры новообразований, метапластических и воспалительных изменений, а также неизмененной слизистой оболочки при проведении конфокальной лазерной эндомикроскопии верхнего отдела пищеварительного тракта у детей.

Показано, что оптическая биопсия наиболее эффективно выявляет метапластические изменения слизистой оболочки пищевода и структуру полиповидных образований верхнего отдела пищеварительного тракта. Для выявления воспалительных изменений слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки наиболее информативным является гистологическое исследование биоптатов.

Определено, что абсолютным показанием к эндоскопической малоинвазивной хирургии являются конфокальные эндомикроскопические признаки аденоматозной структуры полипов слизистой оболочки, что наиболее соответствует лечебной тактике одномоментной диагностики и удаления.

Установлено, что конфокальные признаки нарушения целостности структуры щеточной каймы ворсин тонкого кишечника в виде затеков флуоресцеина с повышенной плотностью клеточных разрывов, являются предикторами обострения умеренной или тяжелой степени тяжести, наступающего в течение последующих 6 месяцев от момента обследования при четком соблюдении протокола выполнения исследования.

Выявлено, что плотность клеточных разрывов эпителия слизистой оболочки подвздошной и двенадцатиперстной кишки не позволяет сделать заключение о тотальном микроскопическом поражении тонкой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника.

Определено, что зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия имеет чувствительность 92,3% и специфичность 95,3% в диагностике кишечной и желудочной метаплазии; чувствительность 88,8% и специфичность 88,3% - при воспалительных изменениях пищевода,

чувствительность 83,7% и специфичность 87,5% при воспалительных изменениях желудка, чувствительность 86,7% и специфичность 81,8% при дуоденитах, чувствительность 92,4% и специфичность 95,2% при верификации структуры полипов верхнего отдела пищеварительного тракта.

Практическая значимость:

Впервые у больных детского возраста в режиме реального времени проведена комплексная эндомикроскопическая оценка воспалительных изменений пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки и уточнены эндомикроскопические признаки изменений слизистой оболочки у детей.

Повышена эффективность внутрипросветного метода исследования в дифференциальной диагностике болезней верхнего отдела пищеварительного тракта.

Оптическая биопсия существенно повышает эффективность традиционного внутрипростветного исследования в диагностике структуры новообразований, метапластических и воспалительных изменений слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей.

Способность оптической биопсии дифференцировать неизмененную и метаплазированную слизистую оболочку помогает в постановке гистологического диагноза, повышает точность ранней диагностики, позволяет определять тактику лечебных мероприятий, их эффективность при осложненной гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у детей.

Зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия обеспечивает не только получение структуры слизистой оболочки в режиме реального времени, но и дает возможность осмотреть ее поверхность на более протяженных участках, а также проводить неограниченное количество оптических биопсий, без ее травматизации.

Способность зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии во время традиционного эндоскопического исследования дифференцировать неизмененную, воспаленную и метаплазированную слизистую оболочку

помогает уточнить гистологический диагноз, повышает эффективность ранней диагностики, позволяет судить о динамике патологических изменений в режиме реального времени, определять стратегию хирургических и лечебных мероприятий и их эффективность при болезнях верхнего отдела пищеварительного тракта у детей. Все это позволит принимать правильные решения в тактике ведения больных, а сокращение количества случайных биопсий и времени на их выполнение сводит риски осложнений к минимуму, что очень важно в педиатрической практике.

При помощи оптической биопсии определена роль барьерной дисфункции тонкой кишки в рецидивировании обострений у больных с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК).

Лапароскопическая фундопликация по Ниссену дает положительный результат в восстановлении замыкательной функции пищеводно-желудочного перехода. Однако на клеточном уровне с помощью зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии не всегда происходит полное исчезновение таких патологических изменений слизистой оболочки, как желудочная и кишечная метаплазия. Эти изменения чаще встречаются у детей с продолжительным течением болезни, поэтому эндомикроскопическое наблюдение за ними в динамике и их хирургическую коррекцию необходимо проводить на более ранних сроках заболевания.

Апробация диссертации и внедрение результатов работы:

Основные положения диссертации доложены на Американской Гастроэнтерологической Неделе (Digestive Disease Week) в 2012, 2013 и 2014 гг. (DDW 2012, Сан-Диего; DDW 2013, Орландо; DDW 2014, Чикаго); VI Европейском Конгрессе Педиатров (6^{th} Europaediatrics, Глазго, Великобритания, 2013); XIV Конгрессе Европейских Детских Хирургов (14^{th} Congress of The European Paediatric Surgeons Association, Лейпциг, Германия, 2013), XIX Российской Гастроэнтерологической Неделе (Москва, 2013) и IV, V, VI, VII Интернациональных Конференций Пользователей Cellvizio (ICCU 2012, Рим, Италия; ICCU 2013, Версаль,

Франция; ICCU 2014, Прованс, Франция, ICCU 2015, Лиссабон, Португалия).

Метод оптической биопсии с эндомикроскопической оценкой структуры поверхности слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта внедрены в практику хирургического и эндоскопического отделений ФГБНУ НЦЗД.

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 1 - в зарубежных рецензируемых журналах.

Метод зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии как эффективное дополнение традиционному внутрипросветному исследованию верхнего отдела пищеварительного тракта рекомендуется для внедрения в детских гастроэнтерологических и эндоскопических центрах. Материалы диссертации целесообразно включить в учебные курсы для слушателей по специальности эндоскопия.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История развития систем для проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии.

Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) – эндоскопическая методика для получения изображений слизистой оболочки пищеварительного тракта с большим увеличением и разрешением. КЛЭМ основана на иллюминации тканей при помощи лазера малой мощности, с выявлением флюоресценции света, отражающегося от поверхности тканей и проходящего через точечное гнездо (пинхол). Термин *конфокальный* означает, что система иллюминации и регистрации изображений находится в одном и том же фокальном плане. Лазер выбранной глубины сканирования фокусируется на ткани, представляющей интерес и, затем отраженный свет регистрируется теми же линзами данной системы. Регистрируется только отражающийся свет, проходящий через точечное гнездо. Свет, отраженный и рассеянный от

иллюминирующего объекта под другим углом или сфокусированный за пределы плана точечного гнезда, не регистрируется устройством. Данное обстоятельство значительно увеличивает пространственное разрешение КЛЭ, позволяя получать изображения на клеточном уровне и оценивать архитектуру ткани в фокальном плане во время эндоскопического исследования.

История конфокальной лазерной микроскопии берет начало в 1955 г. в США, когда американский профессор M. Minsky представил первый опытный образец конфокального микроскопа для исследования нейронной сети в препаратах ткани головного мозга, а также для исследования нервных окончаний клеток кожи без предварительного окрашивания. В его основе лежали две взаимодействующие и связанные друг с другом оптические линзы, а полученные изображения фиксировались на фотопленку. Изобретение намного опередило свое время, и было оставлено без внимания, поскольку в то время просто не существовало компьютерного оборудования, способного обрабатывать полученную информацию [3,4].

В конце 1960-х начале 1970-х гг. M. Petran и M. Egger впервые публикуют изображения ткани головного мозга и клеток ганглиев, полученных при помощи конфокального сканирующего микроскопа, однако технические возможности того времени все еще не позволяли получать высокоточные изображения из-за низких скоростей сканирования, слабости источников света и сложности фиксации результатов исследования на кинопленку [5]. Развитие телевизионных, цифровых и лазерных технологий привели к тому, что в 1980-х гг. несколькими группами ученых были продемонстрированы первые конфокальные изображения тканей головного мозга человека и животных *in vivo* [6,7]. В 1990-ые гг. были созданы более мощные микроскопы на основе высокопроизводительной оптоволоконной оптики, а развитие компьютерных технологий способствовало возникновению нового витка в

развитии конфокальной микроскопии. Первые сообщения о применении конфокального микроскопа для получения изображений *in vivo* роговицы глаза у человека были опубликованы H.D. Cavanagh с соавт. в 1990 г. [8]. В 1995г. конфокальная микроскопия находит клиническое применение в дерматологии, M. Rajadhyaksha с соавт. получают первые *in vivo* изображения кожи человека [9].

До недавнего времени использование эндоскопических методов исследования пищеварительного тракта не позволяло получить эндомикроскопическую картину структуры слизистой оболочки и поставить точный диагноз. Для верификации болезни требовалось проведение многочисленных процедур с взятием биопсии и гистологическим исследованием образцов ткани, что увеличивало затраты на обследование и отнимало значительное время на установление диагноза.

Впервые конфокальная лазерная эндомикроскопия в гастроэнтерологии была использована 2000 г., когда H. Innoue с соавт. исследовали с помощью конфокального микроскопа препараты ткани желудочно-кишечного тракта [10]. В 2004 г. немецкий профессор R. Kiesslich опубликовал первую работу, посвященную получению *in vivo* изображений толстой кишки и выявлению колоректального рака и неоплазий толстой кишки у взрослых больных [11]. Он же был автором первого сообщения о применении конфокальной лазерной эндомикроскопии в диагностике неоплазии при пищеводе Барретта у взрослых больных [12].

Существует несколько видов конфокальной лазерной эндмикроскопии – отражательная, использующаяся в дерматологии, и флюоресцентная, применяющаяся в офтальмологии и гастроэнтерологии. Принцип работы конфокальной лазерной флюоресцентной микроскопии основан на рабочей станции, генерирующей лазерный луч длинной волны 488 нм и передающей его с помощью зеркал, качающихся во

взаимноперпендикулярных направлениях. На выходе из рабочей станции лазерный луч проходит через многоволоконный фиброоптический зонд, проводимый через инструментальный канал эндоскопа или интегрируемый непосредственно в эндоскоп и попадает на поверхность слизистой оболочки. Часть света поглощается, а индуцированный лазером эффект флюоресценции вызывает свечение тканей, которое определяется конфокальным микроскопом, обрабатывается компьютером, позволяя получить динамическое монохромное изображение на мониторе.

На данный момент существует две системы для проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии. Одна производства Pentax (Токио, Япония) интегрирована в дистальную часть эндоскопа и называется эндоскопическая конфокальная лазерная эндомикроскопия (ЭКЛЭМ). Другая система производства Mauna Kea Technologies (Париж, Франция), интегрирована в мини зонды, которые могут быть проведены через инструментальный канал подавляющего большинства гибких эндоскопов, получила название зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия (ЗКЛЭМ).

ЭКЛЭМ обладает разрешением в 0.8 микрон и глубиной сканирования от 0 до 250 микрон, которая регулируется при помощи контроллера на ручке эндоскопа. Изображения выводятся на экран со скоростью 1 кадр в секунду. Одним из недостатков этого метода является размер дистальной части эндоскопа, который составляет 12,8 мм, что может стать существенным ограничением в проведении этого вида исследования в педиатрической практике, особенно у детей младшей возрастной группы.

В отличие от него у ЗКЛЭМ разрешение составляет 1 микрон, а глубина сканирования фиксирована и составляет 40-70 микрон, но в то же время изображения захватываются со скоростью 12 кадров в секунду. Главным преимуществом ЗКЛЭМ следует считать использование мини зондов. Последние диаметром до 2 мм выдвигаются из эндоскопа, а его

оптические волокна проводят свет и изображения. Малый размер зондов позволяет использовать их для исследования не только слизистой оболочки органов пищеварительного тракта, но и бронхолегочной системы, выводных желчевыводящих путей и протоков поджелудочной железы.

В последнее время были выпущены и прошли успешную апробацию зонды для исследования в области гинекологии и урологии.

Кроме того разработан совершенно новый игольчатый зонд, позволяющий исследовать структуру внутренних органов, например печени и поджелудочной железы. Методика носит название игольчатая конфокальная лазерная эндомикроскопия. Миниатюрный зонд выдвигается из иглы и может быть использован для получения оптической биопсии различных кист поджелудочной железы, лимфатических узлов, паренхимы печении других внутренних органов во время лапароскопического исследования или под контролем эндоскопической ультрасонографии. Подробнее технические характеристики зондов представлены в таблице 1.

Таблица 1.Технические характеристики конфокальных мини зондов Cellvizio.

Зонды	Размер рабочего канала (мм)	Длина (м)	Максимальное количество использований	Диаметр зоны осмотра (мкм)	Разрешение (мкм)	Глубина сканирования (мкм)
GastroFlex UHD	2,8	3	20	240	1,0	55-65
AlveoFlex	1,9	3	20	600	3,5	0-50
CholangioFlex	1,0	4	10	325	3,5	40-70
AQ-Flex 19	0,91	4	10	325	3,5	40-70
ColoFlex UHD	2,8	4	20	240	1,0	55-65
UroFlex	1	3	10	325	3,5	40-70

1.2. Характеристики контрастных средств для зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии

Для достижения высококонтрастных изображений структуры слизистой оболочки пищеварительного тракта необходимо использование диагностических средств, обладающих эффектом флюоресценции. Стоит отметить, что при бронхоскопии и исследовании кожных покровов с применением конфокального метода введение контраста не требуется. В структуре этих тканей присутствуют белки эластин и коллаген, которые являются эндогенными флуорофорами и обладают эффектом аутофлюоресцении [8, 13]. Диагностические контрастные вещества можно использовать как местно, так и внутривенно. До настоящего времени оптимальным считается их внутривенное введение. В клинической практике у взрослых наиболее широко применяют 10% раствор флуоресцеина натрия, который, попадая в кровеносное русло, интенсивно связывается с альбуминами сыворотки крови, распространяется через капилляры, проникает в ткани и окрашивает энтероциты, цитоплазму поверхностного эпителия, мембрану, крипты, клеточный инфильтрат и кровеносные сосуды. Клеточное ядро и муцин не окрашиваются и кажутся темными, что может быть объяснено недостаточной абсорбцией флуоресцеина, ускоренным выведением его из клетки или утечки в собственную пластинку. Флуоресцеин быстро метаболизируется печенью в флуоресцеин моноглюкуронид и затем выводится почками. По данным мировой литературы флуоресцеин практически не имеет серьезных побочных эффектов. В офтальмологической практике, где данное контрастное средство начали применять значительно раньше, такие серьезные осложнения как анафилактический шок, тромбофлебит, а также неврологические нарушения по различным данным составляют от 0,05 до 1,1% [14, 15]. Аллергические реакции составляют 1 случай на 22000 больных [16]. Среди этих пациентов учитывая установленную в анамнезе аллергию, необходимость проведения исследования, диктовала назначение

десенсибилизирующей терапии. В публикациях, посвященных применению флуоресцеина у взрослых больных с гастроэнтерологической патологией (пищевод Баррета, колоректальные полипы, рак билиарного тракта) серьезных побочных эффектов выявлено не было [17].

К другим побочным эффектам, описанным у взрослых, возникших при проведении конфокальной эндомикроскопии пищеварительного тракта следует отнести кратковременную гипотензию, легкую тошноту, развитие воспалительной реакции в месте инъекции, самокупирующуюся сыпь, незначительные эпигастральные боли. Все эти нежелательные явления наблюдались в 1,4% случаев [17]. В офтальмологии незначительную тошноту, и, за редким исключением, рвоту, возникавшие практически сразу после введения препарата при дозе свыше 5 мл, отмечались у 2-10% больных [15]. M.B. Wallace с соавт. в проспективном мультицентровом исследовании сообщили об отсутствии разницы в возникновении незначительных побочных эффектов в зависимости от дозы флуоресцеина (2,5-5мл 10% раствора флюоресцеина и 0,1мг/кг 1% раствора), а также не выявили связи между торговыми марками препарата и частотой возникновения побочных эффектов. У всех больных наблюдались кратковременное пожелтение кожных покровов и/или яркое желтое окрашивание мочи, которые бесследно купировались в течение 2-3 часов [17].

Другие исследователи определили оптимальную дозу и время между внутривенным введением флуоресцеина и получением оптимального изображения. Так, V. Becker с соавт. описали, что оптимальную конфокальную картину можно получить в течение 0-8 минут после инъекции и наблюдать приемлемые изображения до 30 минут после введения [18,19].

Единственным недостатком флуоресцеина является отсутствие прямой визуализации ядер клеток. Попытки его компенсации местным применением 0,2% акрифлавин гидрохлорида увенчались успехом, однако,

препарат запретили к применению после выявления его мутагенных свойств. Оказалось, что акрифлавин связывается с нуклеиновыми кислотами и влияет на ДНК клетки [20]. В последнее время появилось мнение, что акрифлавин можно заменить 2% крезил виолетом, но пока в мировой литературе описаны удачные опыты только с участием животных [21].

В настоящее время в поисках замены общепринятых диагностических контрастных средств ведутся активные исследования с использованием биомаркеров, которые, накапливаясь в клетках-мишенях (например, в неопластических), будут вызывать эффект аутофлюоресценции, что позволит значительно повысить чувствительность метода и исключить ошибки при интерпретации оптической биопсии.

1.3 Методика проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии пищеварительного тракта и интерпретация полученных изображений

Опыт применения методики ЗКЛЭМ пищеварительного тракта описан только у взрослых больных. Согласно инструкции по ее применению, необходимо осуществить настройку оборудования в соответствии с предписанием, выполнить калибровку зонда и подготовить его к работе. В целях минимизации артефактов, обусловленных контактной кровоточивостью и минимальным повреждением тканей, зонд должен аккуратно соприкасаться с поверхностью слизистой оболочки без излишнего давления или травматизации тканей. Наиболее оптимальным следует считать перпендикулярное расположение зонда к поверхности слизистой оболочки. Поддержание стабильности зонда имеет решающее значение в получении качественных изображений, что не всегда легко выполнить при осмотре пищевода. Для системы ЭКЛЭМ стабильность зонда обеспечивается присасыванием интересующего участка ткани при

помощи эндоскопа. Использование системы ЗКЛЭМ для осмотра пищевода требует определенных усилий для поддержания стабильности и перпендикулярного расположения зонда по отношению к слизистой оболочке. Эта задача может быть облегчена при использовании 4мм колпачка, надеваемого на дистальную часть эндоскопа, что позволяет присасывать окружающую ткань при помощи эндоскопа, обеспечивая стабильность зонда и сохраняя датчик в нужном месте. Как только патологическая область идентифицирована при эндоскопическом осмотре, к слизистой оболочке подводится дистальная часть эндоскопа (у системы ЭКЛЭМ) или зонд (у системы ЗКЛЭМ) и, скользя по ее поверхности, выполняется процесс лазерного сканирования. Это сопровождается появлением на экране динамически меняющейся монохромной микроскопической картины структуры слизистой оболочки, которая может быть записана и воспроизведена для детального анализа.

Дезинфекция зонда осуществляется растворами, используемыми в автоматических репроцессорах аналогично дезинфекции высокого уровня эндоскопов. Учитывая увеличение продолжительности времени диагностической процедуры в интервале от 15 до 30 минут и поддержания стабильности получаемых изображений исследование требует хорошей седации или общего обезболивания.

Визуальная картина, получаемая при конфокальной эндомикроскопии далека от традиционных эндоскопических изображений и в большей степени понятна специалистам в области микроскопии. Именно поэтому для решения вопросов интерпретации полученных данных многие авторы сходятся во мнении о необходимости, привлечения к исследованиям данного рода морфологов. Эндоскопист выполняющий конфокальную эндомикроскопию, должен обладать фундаментальными знаниями в оценке нормальной и патологически измененной слизистой оболочки пищеварительного тракта. Он не может заменять морфолога, но должен дифференцировать неизмененную и патологически измененную

слизистую оболочку, чтобы произвести взятие биопсии для последующего гистологического исследования. Стоит также отметить, что конфокальные изображения отличаются от традиционных гистологических препаратов, поскольку имеют не продольную, более привычную для морфологов, а горизонтальную ориентацию срезов, поэтому они в отличие от гистологии не могут одновременно показать структуру как подслизистого, так и слизистого слоя.

Кроме того, необходимо придерживаться общепринятых классификаций, стандартов для адекватной интерпретации конфокальных изображений нормальной и патологически измененной слизистой оболочки пищеварительного тракта, чтобы свести к минимуму погрешности при оценке вариабельности этих изменений, особенно у детей.

В мировой литературе были разработаны классификации конфокальных изображений, которые показывают тесную взаимосвязь между конфокальными изображениями во время исследования и традиционной гистологической картиной слизистой оболочки пищеварительного тракта у взрослых пациентов.

R. Kiesslich с соавт. впервые описали неизмененную, регенеративную и неопластическую структуру ткани при конфокальной эндомикроскопии толстой кишки, которые в последующем были названы критериями Майнца (Mainz criteria) [11]. Другие исследователи дополнили ее описанием структуры колоректальных полипов [22].

В 2010 году P. Wang разработал классификацию тяжести гастрита ассоциированного с *H. pylori* у взрослых, диагностируемого при помощи ЭКЛЭМ, которая включала описание неизмененной слизистой оболочки желудка, 3 стадии воспалительного процесса, ассоциированного с *H.pylori*, и кишечную метаплазию желудка с атрофией желез [23]. В 2011 году специально для ЗКЛЭМ была разработана классификация Miami, в которой описывались неизменная и патологическая структура слизистой

оболочки пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки, билиарного тракта, кроме того в ней указаны конфокальные критерии для определения гиперпластических и аденоматозных полипов [24]. В 2012 г. R. Kiesslich с соавторами разработали классификацию степени нарушения барьерной функции кишечника при ВЗК, названную шкалой Watson [25].

По мнению некоторых авторов, чтобы стать опытным специалистом в области ЗКЛЭМ, необходимо провести разбор не менее 50-70 случаев и пройти 2-часовую тренировку по интерпретации изображений [26].

1.4. Клиническое применение конфокальной лазерной эндомикроскопии.

Конфокальная лазерная эндомикроскопия успешно и широко применяется в офтальмологии, дерматологии, а в последнее время в гастроэнтерологии, пульмонологии, урологии, гинекологии и хирургии у взрослых пациентов.

Колоректальный рак занимает 4-е место в мире в структуре всех онкологических заболеваний и находится на 2-м месте по смертности от рака в развитых странах мира [27]. Его диагностика чрезвычайно важна на ранней стадии развития болезни. От этого напрямую зависит тактика дальнейшего лечения и выживаемость больных. Поэтому первое применение конфокального метода в гастроэнтерологии, опубликованное в 2004 г. R. Kiesslich с соавт. было посвящено именно колоректальному раку. В этой работе описана характеристика неизмененной, неоплазированной и дисплазированной слизистой оболочки толстой кишки, и соотнесены результаты конфокальной эндомикроскопии и гистологического исследования. Так у 42 взрослых пациентов наличие неопластических клеток было выявлено с точностью 99,2%, специфичностью 99,4% и чувствительностью 97,4% [11].

Нередко колоректальный рак развивается из полиповидных образований слизистой оболочки, поэтому основной задачей колоноскопии

является верификация полипов на стадии предрака и их своевременное удаление. G.D. De Palma с соавт. описал применение КЛЭМ для дифференциальной диагностики колоректальных полипов. Исследование 32 мелких полипов размером от 1 до 9 мм у 20 взрослых больных позволило выявить неоплазию с чувствительностью 100% и специфичностью 85% [28].

Сочетание этого метода с другими внутрипросветными технологиями позволяет улучшить точность в диагностике колоректальных полипов. Так, колоноскопия с электронной хромоскопией, дополненная ЗКЛЭМ 130 полипов более 10 мм в диаметре, диагностировала их неопластическое перерождение с чувствительностью и специфичностью 94% и 97%, соответственно [29].

Дифференцировать доброкачественные и злокачественные стриктуры желчевыводящих протоков довольно трудно, даже не смотря на многообразие имеющейся аппаратуры. Это связано с тем, что забор ткани для гистологического исследования из-за сложности выполнения исследования выполняется случайным образом [30]. Браш-биопсия и аспирация при помощи иглы имеют низкую диагностическую точность [31]. Поэтому установление диагноза рака желчевыводящих протоков, как правило, затягивается, и требует либо хирургического вмешательства, либо длительного наблюдения [32]. ЗКЛЭМ применяют для выявления данной патологии при эндоскопической ретроградной холангиопанкреатоскопии. Мини зонд проводят к слизистой оболочке при помощи таких устройств, как холангиоскоп SpyGlass (Boston Scientific, Natick, Массачюсеттс, США) или Olympus (Токио, Япония). A. Meining с соавт. использовал ЗКЛЭМ при билиарных стриктурах у 14 взрослых больных: точность, чувствительность и специфичность составили 86%, 83% и 88%, соответственно [33]. M. Giovannini с соавт. провели ЭРХПС в сочетании с ЗКЛЭМ у 37 больных, из которых стеноз желчевыводящих протоков подтвердился у 30 пациентов, а у 7-ми было произведено

удаление камней из желчевыводящих протоков. Результаты оптической биопсии показали, что в структуре стенотического поражения желчевыводящих протоков преобладало злокачественное перерождение у 23 больных, против доброкачественного у 7. Неопластические изменения определялись с точностью 86%, чувствительностью 83% и специфичностью 75% [34].

Пищевод Барретта (ПБ) - это замещение цилиндрическим эпителием слизистой оболочки в дистальном отделе пищевода с гистологическим подтверждением кишечной метаплазии [1]. В 1950 г. данная патология была описана Норманном Барреттом. Интерес этому осложнению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни среди взрослых пациентов вызван высоким уровнем аденокарциномы, диагностируемой на неизлечимой стадии болезни. По мнению некоторых авторов, при пищеводе Барретта риск возникновения аденокарциномы увеличивается в 20-60 раз [35]. Поэтому все внимание акцентировано на ранней диагностике неоплазии слизистой оболочки во время наблюдения в скрининговых программах. В настоящее время основным методом диагностики пищевода Барретта является эндоскопическое исследование с множественными биопсиями пораженного участка слизистой оболочки. Метод взятия четырех биопсии из каждого квадрата пораженного участка, выполняемый через каждые 2 см, при ГЭРБ, осложненной ПБ, приводит к дополнительной травматизации слизистой оболочки, психологической нагрузке на больного, увеличению необходимого времени и финансовых расходов, связанных с гистологическим исследованием. В 2006 г. R. Kiesslich с соавт. впервые опубликовали данные исследования о применении метода конфокальной эндомикроскопии при ПБ у 63 взрослых пациентов. По результатам данного исследования ПБ и неопластическое перерождение слизистой пищевода могут быть диагностированы с чувствительностью 98,1% и 92,9% и специфичностью 94,1% и 98,4% соответственно [12]. Другие авторы в двойном слепом

рандомизированном исследовании по диагностике дисплазии при ПБ у 38 взрослых больных показали более низкую чувствительность метода 80%, при схожей специфичности 94% [36].

Эозинофильный эзофагит (ЭЭ) – воспалительное хроническое иммуно/антиген опосредованное заболевание, характеризующееся выраженной эозинофильной инфильтрацией слизистой оболочки пищевода [37]. Еще 15 лет назад эти изменения считались редкой патологией, однако в последнее время, по данным мировой литературы частота, выявления ЭЭ возросла и составляет от 0,01% до 0,1% в популяции педиатрических и взрослых больных [38-40]. Этиология данного заболевания полностью не раскрыта, и некоторые эксперты полагают, что долговременно протекающая эозинофильная инфильтрация слизистой оболочки может повреждать стенку пищевода, приводя к фиброзу собственной пластинки, сужениям и стриктурам [41,42]. Диагноз устанавливают после проведения эндоскопического исследования с биопсией слизистой оболочки пищевода, и если количество эозинофилов в биоптате превышает 15-24 в поле зрения, оно является гистологическим критерием верификации ЭЭ [43,44]. Это дает возможность клиницистам скорректировать необходимую терапию [45]. Некоторые авторы подчеркивают важность количества взятых биоптатов, поскольку чувствительность гистологического исследования к ЭЭ по результатам лишь 1 биопсии составляет только 55%, в то время как 5 фрагментов дают 100% результат [44]. В этой связи определенный интерес представляет роль КЛЭМ в диагностике ЭЭ. Недавнее исследование показало расширение межклеточных пространств и капилляров, при этом сохранялась структура “сквамозного” эпителия, отмечены капиллярные утечки флуоресцеина и скопление в межклеточных пространствах мелких клеток схожих с эозинофилами [46]. На данный момент это единственная опубликованная в мировой литературе работа, посвященная диагностике ЭЭ *in vivo*.

Однако существует мнение, что эозинофилы имеют сильный спектральный кодируемый конфокальный сигнал, что позволяет использовать для диагностики этой патологии отражательную конфокальную лазерную микроскопию [47]. *Ex vivo* исследование биопсий было проведено у больных с ЭЭ при помощи отражательного сканирующего лазерного микроскопа [48]. При помощи гистологического исследования и конфокальной микроскопии H. Yoo было проанализировано 43 биопсии. Моделированное рассеивание света из клеток показало, что большие органеллы, находящееся в цитоплазме эозинофилов, обладают большим коэффициентом преломления, проявляя сильное обратное оптическое рассеивание, и, следовательно, сильный спектральный кодируемый конфокальный сигнал. К этим органеллам, состоящим из белка, относят эозинофил пероксидазу, эозинофильный катионный белок и эозинофильный нейротоксин. Чувствительность и специфичность между конфокальной микроскопией и гистологическим исследованием по обнаружению эозинофилов составила 100% [48].

Тем не менее, на сегодняшний день еще не существует технологий, способных уменьшить отражающий конфокальный микроскоп до размеров, необходимых для эндоскопических исследований. Однако существующие коммерческие аналоги, работающие при помощи флуоресцентных красителей, в будущем могут быть модифицированы для получения отражательных конфокальных изображений, давая возможность получать эндомикроскопическую картину *in vivo* без введения контрастных средств [49].

Helicobacter pylori является одной из основных причин развития патологических изменений слизистой оболочки желудка, приводящих к хроническому гастриту, язвенной болезни и раку желудка [1,50]. Согласно Сиднейской классификации гастритов 1996г. выявлена четкая взаимосвязь между хеликобактерной инфекцией и гистологическими признаками гастрита [51]. Атрофический гастрит, особенно сопровождающийся

метаплазией слизистой оболочки, является высоким фактором риска для развития рака желудка и тесно связан с *H. pylori.* P. Wang в своей работе о состоянии слизистой оболочки желудка у 118 взрослых больных при помощи ЭКЛЭМ, отметил хорошую корреляцию конфокального метода исследования и гистологической картины. КЛЭМ обладает чувствительностью и специфичностью к выявлению *H.pylori* 82,9% и 90,9% соответственно, а кишечной метаплазии желудка - 98,6% и 100% соответственно, атрофии желез - 92,9% и 95,2% соответственно [23].

Глютен при целиакии является медиатором энтеропатии, приводящей к диффузной атрофии ворсинок и гипертрофии крипт тонкого кишечника. Несмотря на значительное усовершенствование специфических серологических тестов, основой для постановки диагноза является гистологическое исследование биоптатов, полученных при эзофагогастродуоденоскопии из двенадцатиперстной и начального отдела тощей кишки. Снижение размера складок, их изъязвления, наличие мозаичного рисунка и нодуллярная поверхность слизистой оболочки, - являются основными для верификации эндоскопической картины целиакии. Поражение слизистой оболочки может быть очаговым, поэтому для гистологического подтверждения диагноза необходимо взять не менее 4 биопсий [52]. Учитывая вышесказанное, конфокальная эндомикроскопия у таких пациентов может быть потенциально полезным методом диагностики.

R.W. Leong с соавт. описал конфокальные изменения при целиакии у 31 взрослого больного, отметив тесную корреляцию КЛЭМ с гистологической классификацией степени атрофии по Marsh. Чувствительность составила 94%, специфичность - 92%. Полученные данные подтвердили значимую роль КЛЭМ в верификации диагноза целиакии и позволили оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий [53].

Одной из актуальных проблем современной гастроэнтерологии являются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) [1,50]. Данные болезни характеризуются хронически рецидивирующим воспалительным процессом, а для точного подтверждения ремиссии необходимо взятие биопсийного материала для последующего гистологического исследования [54]. Очень часто клинические и эндоскопические признаки ремиссии ВЗК опережают их гистологические критерии.

При комплексном обследовании 29 детей с данной патологией в ФГБНУ НЦЗД было выявлено, что у 20,7% пациентов клинические и эндоскопические признаки ремиссии не соответствуют выявленным гистологическим изменениям [55]. При сравнении результатов гистологии и КЛЭМ чувствительность составила 100%, специфичность - 67% [55]. Полученные результаты говорят о необходимости более детального изучения эндоскопически визуально неизмененной слизистой оболочки у детей с ВЗК.

В то же время КЛЭМ может сокращать количество излишних и случайных биопсий, произведенных для гистологической оценки активности воспалительного процесса [55]. У взрослых больных скрининг программы ВЗК направлены, прежде всего, на выявление раннего рака. У больных с протяженным поражением кишечника, протекающим более 8 лет, увеличивается риск развития колоректального рака [56]. При колоноскопическом исследовании у взрослых при подозрении на диспластические изменения, рекомендуют производить как прицельный, так и случайный забор ткани для биопсии. Фрагменты ткани берутся четырехквадрантным методом каждые 10 сантиметров от слепой до прямой кишки, минимально получая 32 фрагмента для гистологического исследования. Однако случайные биопсии, не несущие диагностической информации, значительно снижают шансы обнаружить диспластические изменения [39].

В недавнем проспективном рандомизированном исследовании 161 больного сравнивали результаты традиционной колоноскопии с взятием биоптатов слизистой оболочки с колоноскопией, дополненной хромоэндоскопией и КЛЭМ. Последний метод исследования выявил в 4,75 раз больше диспластических изменений, чем обычный протокол взятия биопсий. При этом комбинирование хромоэндоскопии и КЛЭМ позволило вдвое снизить количество необходимых биопсий, без увеличения времени, затраченного на проведение процедуры [56].

Сейчас ведутся активные исследования по выявлению факторов, способствующих обострению воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). В числе прочих, рассматривается и теория о том, что нарушение барьерной функции кишечника ведет к рецидиву заболевания [25, 57, 58]. ВЗК – хронические воспалительные заболевания, вызванные нерегулируемым иммунным ответом у генетически предрасположенного человека [59]. Провоспалительные цитокины, особенно фактор некроза опухоли α (ФНО-α) , также играют важную роль в патогенезе ВЗК [60]. ФНО-α известен тем, что стимулирует выпадение эпителальных клеток из тонкого кишечника [61]. Обновление кишечного эпителия это непрерывный физиологический процесс: стволовые клетки, расположенные в основании крипт созревают и мигрируют в ворсину. “Состарившееся” эпителиальные клетки со временем выпадают из кончика ворсины [58]. В свою очередь выпадение эпителиальных клеток при определенных обстоятельствах может способствовать возникновению воспалительной реакции и изъязвления слизистой оболочки [62-63]. Впервые разрывы щеточной каймы ворсин в результате выпадения эпителиальных клеток у здоровых пациентов, проходящих скрининговую колоноскопию, *in vivo* при помощи конфокальной лазерной эндомикроскопии были описаны в 2007 г. R. Kiesslich [64]. До появления данного метода точное гистологическое подтверждение эпителиальных разрывов ограничивалось размерами биоптата и артефактами при

фиксации образцов. В 2011 г. вышеуказанный автор обследовал 47 больных с язвенным колитом (ЯК) и 11 пациентов с болезнью Крона (БК) в стадии ремиссии, 12 больных, проходивших программу скрининга колоректального рака, но не страдающих ВЗК или не имеющих каких-либо кишечных симптомов, были включены в группу контроля. Всем больным выполнялось традиционное эндоскопическое исследование, конфокальная лазерная эндомикросокопия и биопсия слизистой оболочки подвздошной кишки с последующим гистологическим исследованием. У больных ВЗК по сравнению с группой контроля, авторы обнаружили множественные нарушения целостности структуры щеточной каймы у ворсин подвздошной кишки и составили шкалу, которая характеризовала тяжесть этих повреждений, варьировавшую от точечных затеков флюоресцеина до микроэрозий. Чувствительность, специфичность и точность данной шкалы в способности предсказывать обострение ВЗК у взрослых составила 62,5%, 91,2% и 79%, соответственно [25].

Принимая во внимание вышесказанное и исходя из того, что выпадение клеток эпителия - это физиологический процесс, J.J. Liu с соавторами, пришли к выводам, что качественного описания присутствия и отсутствия разрывов щеточной каймы не достаточно для того, чтобы отличать здоровых людей от больных [65]. В одном из своих исследований они предложили количественную оценку распространенности эпителиальных разрывов щеточной каймы ворсин тонкого кишечника и разработали специальную числовую меру: плотность разрывов [66]. Плотность клеточных разрывов расценивали как общее число клеточных разрывов на 1000 клеток подсчитанных в видимой ворсине. В своем пилотном исследовании авторы сравнили плотность клеточных разрывов у пациентов с установленной БК и у лабораторных мышей, у которых отсутствовал интерлейкин-10, получив схожие показатели плотности клеточных разрывов [66].

Инфекция вызванная *Clostridium difficile*, является одной из наиболее клинически значимых причин госпитальных диарей, вызываемых внутрибольничной флорой. Инфицирование *C. Difficile* сопровождается лихорадкой, лейкоцитозом и часто возникает у пожилых людей или больных с ослабленным иммунитетом. Тем не менее, последние данные показывают, что даже молодые и здоровые люди, до этого не наблюдавшиеся в лечебных учреждениях или не подвергавшиеся антимикробной терапии, не являются исключением для данной патологии [67,68]. *C. dificile* могут колонизировать толстую кишку, и в присутствии антибиотика, ограничивающего рост нормальной микрофлоры, продуцировать эндо- и цитотоксины, вызывающие серьезные повреждения слизистой оболочки, в результате чего поражение толстой кишки эндоскопически будет выглядеть как псевдомембранозный колит [67]. Было выявлено, что на долю *C. difficile*–ассоциированного воспаления приходится около 25% антабиотико-ассоциированных диарей и большиство случаев псевдомембранозного колита. В США ежегодно регистрируют около 300 000 случаев *C. dificile*-ассоциированных диарей [68]. Быстрая и точная диагностика *C. dificile* имеет решающее значение не только в составлении индивидуального плана лечения для пациента, но и для предотвращения внутрибольничной инфекции. В настоящее время диагностика *C. dificile*-ассоциированного воспалительного процесса основана на сборе анамнеза и лабораторных исследованиях, включающих выращивание токсигенных культур, остающееся золотым стандартом в диагностике данной патологии [69].

Группа немецких ученых в своем исследовании предположили, может ли конфокальная лазерная эндомикроскопия выявить гистологические изменения, ассоциированные с *C. dificile in vivo*, а также возможно ли определять присутствие *C.dificile* при помощи КЛЭМ. Авторы отметили тесную корреляцию между гистологической картиной и

эндомикроскопией. Чувствительность метода составила 88,9%, специфичность - 97,2%, точность - 96,2% [70].

Микроскопический колит, включающий лимфоцитарный и коллагенозный колиты, характеризуется нормальной картиной эндоскопически визуализируемой слизистой оболочки при традиционной колоноскопии, но больные при этом страдают рецидивирующей диареей. Микроскопические изменения в проксимальных отделах толстой кишки часто располагаются неоднородно, что создает определенные трудности для постановки диагноза при взятии случайной биопсии. Некоторые авторы в своих работах с применением КЛЭМ описывают визуализацию лимфоцитарного инфильтрата при лимфоцитарном колите и видимые “оболочки” вокруг крипт, соответствующие субэпителиальной коллагеновой пластинке при коллагенозном колите. КЛЭМ помогает провести прицельную биопсию слизистой оболочки, что существенно помогает при постановке диагноза микроскопического колита [71-73]. Однако на данный момент статьи, посвященные применению КЛЭМ при микроскопическом колите, являются описанием лишь отдельных клинических случаев, поэтому чувствительность, специфичность и точность метода в диагностике микроскопического колита должна быть определена в последующих проспективных исследованиях.

Иммунная реакция отторжения - одно из тяжелых осложнений при трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток. Различие между острой и хронической реакцией раньше определяли по времени, прошедшего с момента трансплантации (более или менее 100 дней) [74]. Сейчас это утверждение признали неверным, поскольку и острая и хроническая формы отторжения имплантата встречаются как до, так и после 100 дней, прошедших с момента операции, а у некоторых пациентов возможно сосуществование обеих форм, когда одна форма может клинически “перекрывать” другую [75]. Болезнь обычно поражает кожу, печень и кишечник. Острая форма иммунной реакции отторжения

имплантата нередко сопровождается диареей, анорексией, диспепсией, тошнотой и рвотой. Ранняя диагностика при помощи эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС) или ректороманоскопии с забором биоптата слизистой оболочки, позволяет вовремя увеличить дозу иммуносупрессивной терапии [76]. Пациенты с умеренными проявлениями иммунной реакции отторжения имплантата могут иметь эндоскопически неизмененную слизистую оболочку толстой кишки, тогда как у больных с тяжелыми проявлениями этой реакции макроскопические изменения слизистой оболочки выражены значительно. Нередко это диктует необходимость взятия многочисленных биоптатов для гистологического исследования. Сопутствующая в большинстве случаев тромбоцитопения и коагулопатия повышают потенциальный риск возникновения кровотечения после взятия биопсии, требует переливания тромбоцитарной массы или факторов свертывания крови у данных пациентов. Традиционное гистологическое исследование с фиксацией биоптатов в растворе формалина и окраской гематоксилином и эозином является стандартом в диагностике иммунной реакции отторжения трансплантата. Важно получить гистологическое подтверждение диагноза, так как диарея – это обычное явление после трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток, и она может быть вторичной в результате антибиотикотерапии или приема других лекарственных препаратов.

Гистологический признак активной иммунной реакции отторжения трансплантата - это присутствие апоптозных клеток в просвете крипт. Считается, что их число должно быть ≥ 1 на биоптат, хотя и не является общепринятым стандартом [77]. Эндомикроскопическим критерием апоптозной клетки является ее 100% местное окрашивание акрифлавином. Согласно этому, C. Bojarski с соавторами сравнили традиционную ректороманоскопию, дополненную двумя биопсиями слизистой оболочки и гистологическим исследованием, с результатами конфокальной лазерной эндомикроскопии с прицельной биопсией у 35 больных острой диареей

после трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток. Эндоскопически визуализируемая семиотика показала изменения слизистой оболочки от умеренного до выраженного с эрозивным поражением, только у 6 больных, тогда как гистологические признаки иммунной реакции отторжения трансплантата подтверждены у 19 больных, из которых у 14 этот диагноз был поставлен при помощи эндомикроскопии [78]. Следует отметить, что эндоскопически визуализируемая картина неизмененной слизистой оболочки толстой кишки в половине наблюдений сопровождалась эндомикроскопическим выявлением единичных клеток с признаками апоптоза и свидетельствовала о ранней иммунной реакции отторжения трансплантата. Среди других эндомикроскопических критериев, указывающих на реакцию отторжения, необходимо выделить апоптоз всей крипты целиком, капиллярные утечки флюоресцеина, очаговую деструкцию крипт и в некоторых случаях отсутствие крипт. Анализ эндомикроскопической картины группы контроля, состоящей из 30 больных с инфекционным и язвенным колитом, ни у одного из них не показал изменений, характерных для иммунной реакции отторжения трансплантата. Таким образом, чувствительность метода конфокальной эндомикроскопии по отношению к гистологической картине составила 74%, а специфичность - 100% [78], что позволяет проводить раннюю диагностику реакции отторжения трансплантата на начальной стадии, определять зону поражения для взятия прицельных биоптатов и, повышая дозу имууносупрессоров, эффективно управлять лечебными мероприятиями, уменьшая риск развития осложнений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика клинического материала

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении “Научный центр здоровья детей” (ФГБНУ НЦЗД), директор – академик РАН, д.м.н., проф. А.А. Баранов.

В период с 2011 по 2014 гг. в гастроэнтерологическом отделении с гепатологической группой (зав. отд. - д.м.н., проф. А.С. Потапов), отделении общей хирургии (зав. отд. - д.м.н., проф. Д.А. Морозов) и нефрологическом отделении (зав. отд. - д.м.н., проф. А.Н. Цыгин) по поводу основного заболевания обследовано 116 детей, 78 мальчиков, 38 девочек в возрасте от 3 до 18 лет (средний возраст 11,3 ± 4 года) (таблица 2).

Таблица 2. Распределение обследованных детей по полу и возрасту

Возрастные периоды	**Мальчики**		**Девочки**		**Всего**	
	N	%	N	%	N	%
3-7 лет	12	10,3	8	6,9	20	17,2
8-12 лет	32	27,6	10	8,7	42	36,2
13-18 лет	34	29,3	20	17,2	54	46,6
Всего	78	67,2	38	32,8	116	100

В той или иной степени выраженности течение болезни сопровождалось рядом патогномонических проявлений, среди которых гастроэнтерологический наблюдались у всех детей.

Нозологические формы болезней верхнего отдела пищеварительного тракта (ВОПТ) были представлены хроническим гастродуоденитом и

язвенной болезнью желудка или двенадцатиперстной кишки у 28 больных, клиническими проявлениями гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) у 62 пациентов, ВЗК (БК, ЯК) у 24 детей Полиповидные образования верхнего отдела пищеварительного тракта (ВОПТ) встречались у 26 детей с вышеперечисленными нозологическими формами заболевания. Диагноз целиакии был установлен в 2 случаях (рис. 1).

Большинство детей наблюдались в отделении гастроэнтерологии с гепатологической группой (табл. 3). В исследование были включены 11 детей из нефрологического отделения с основным диагнозом нефротический синдром. Данным детям из-за проводимой терапии по поводу основного заболевания требовалось проведение эндоскопического обследования ВОПТ. Из этих 11 детей у 7 был обнаружен хронический гастродуоденит, у 3 язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки (ДПК), у 1 ГЭРБ, в 3 случаях были верифицированы полиповидные образования пищевода и желудка.

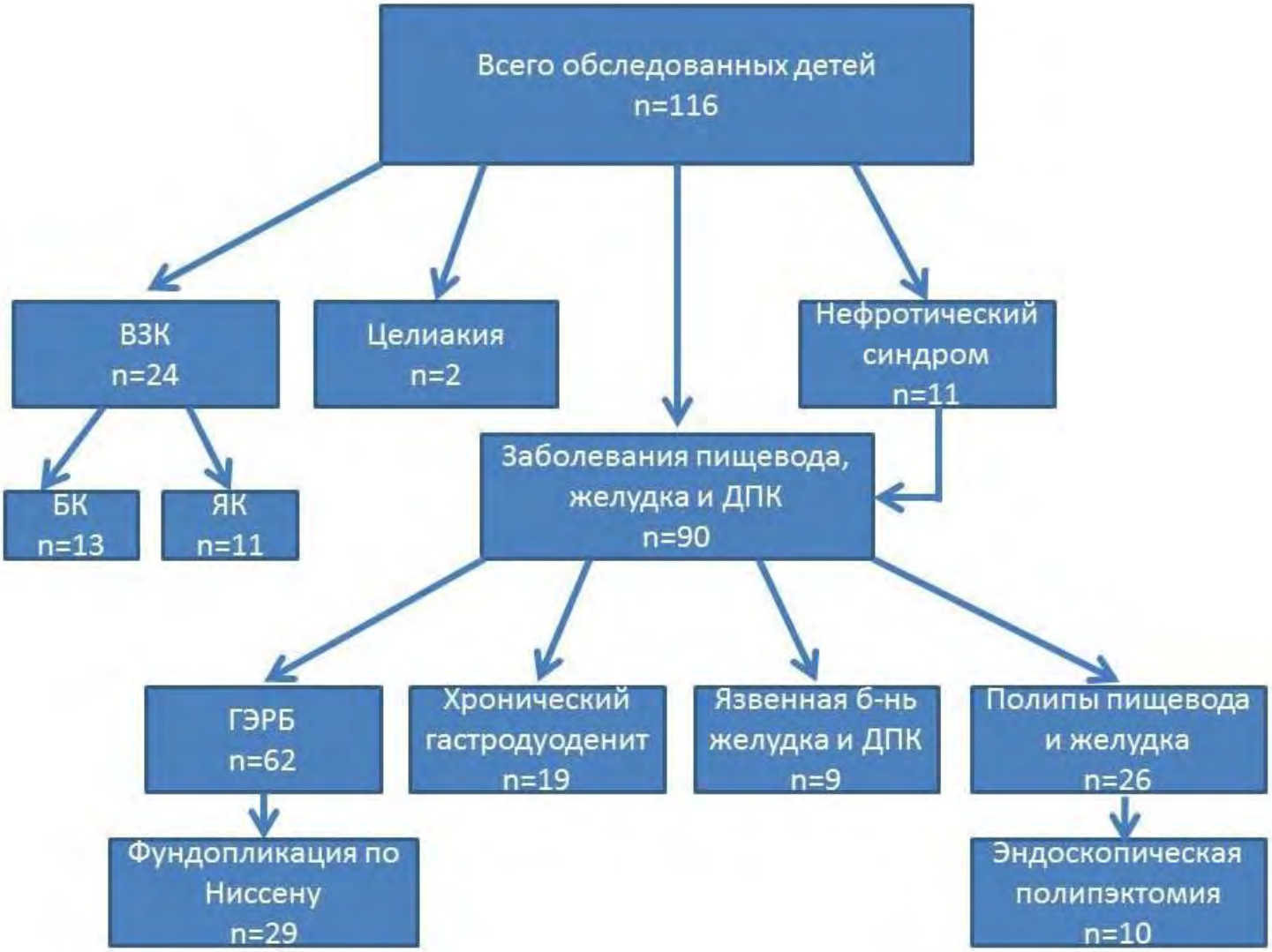


Рис. 1. Распределение обследованных детей по нозологическим формам заболевания.

Таблица 3. Распределение обследованных детей по нозологическим формам заболевания.

Болезни ВОПТ	**Гастроэнтерология с гепатологической группой**	**Общая хирургия**	**Нефрология**	**Всего**
ГЭРБ	32	29	1	62
ВЗК (БК, ЯК)	24	-	-	24
Язвенная болезнь желудка и ДПК	6	-	3	9
Хронический гастродуоденит	12	-	7	19
Целиакия	2	-	-	2
Всего	76	29	11	116
Полиповидные образования ВОПТ	13	10	3	26

При оценке клинических проявлений заболеваний ВОПТ рассматривались следующие симптомы: болевой, диспепсический, хронической интоксикации.

При болевом синдроме оценивалась локализация, длительность, частота и интенсивность болевых ощущений, а также их зависимость от приема пищи.

Диспепсический синдром проявлялся тошнотой, рвотой, нарушениями стула, отрыжкой и изжогой. Хроническая интоксикация была представлена субфебрильной температурой, нарушением аппетита, астено-невротической симптоматикой.

В группу сравнения вошли дети с гистологическим подтверждением не измененной слизистой оболочкой ВОПТ.

2.2. Методы исследований

Эндоскопические исследования органов ВОПТ, дополненные конфокальной лазерной эндомикроскопией, проводились в эндоскопическом отделении. Гистологические исследования биоптатов слизистой оболочки проводились в патологоанатомической лаборатории ФГБНУ НЦЗД (зав. – д.м.н., проф. А.Г. Талалаев).

Эндоскопическое исследование пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки выполняли с помощью видеоэндоскопического оборудования Fujinon EPX4400 и видеогастродуоденоскопа Fujinon EG450WR5 (Fujifilm Corp., Токио, Япония). Процессор системного видеоцентра EPX4400 был совместим со стандартом высокой четкости, что позволило получать резкое и четкое изображение даже при исследовании мельчайших объектов на слизистой оболочке (рис. 2).

Помимо обычного осмотра в белом свете, для повышения точности и надежности результатов эндоскопической диагностики использовали систему технологий спектральной обработки изображений FICE, которая позволила получать изображения, содержащие только определенные длины волн, подчеркивающие нужные характеристики изменения тканей и сосудов.

Все исследования выполнялись одномоментно, не прерывая исследования и не отрывая своего взгляда от монитора.

Эндоскопические изображения формировались в результате освещения участка ткани светом ксеноновой лампы (длина волны от 400 до 700 нм) и регистрации отраженного света с помощью матрицы. Полученные таким образом изображения преобразовывались с помощью технологии FICE в новые изображения, которые содержали только определенные длины волн, позволяющие значительно улучшить

эффективность эндоскопической диагностики заболеваний верхних отделов пищеварительного тракта.

Показаниями к проведению ЭГДС служили клинические проявления заболеваний, их осложнения или необходимость проведения дифференциальной диагностики.

Для описания эндоскопической картины при выполнении диагностической ЭГДС органов ВОПТ использовали общепринятую минимальную стандартную терминологию Европейского Общества Гастроинтестинальной Эндоскопии (1995г.). Интерпретацию эндоскопической семиотики, характерной для эзофагита, производилась по классификации G. Tytgat в модификации В.Ф. Приворотского [79] (табл. 4), для гастрита - по Сиднейской классификации гастритов [51] (табл. 5), для целиакии - по общепринятой, характерной для болезни эндоскопической семиотике – утолщение и поперечная исчерченность складок, неровная, нодуллярная поверхность и нарушение целостности слизистой оболочки тощей кишки. Все эндоскопические находки подтверждались гистологическим исследованием.

В отдельную группу для оценки нарушения барьерной функции тонкой кишки были включены 24 больных с гистологически подтвержденным диагнозом ВЗК БК или ЯК. Стадия болезни оценивалась как активная (выявление соответствующих симптомов) или неактивная (асимптоматические больные проходившие скрининг ВЗК). В базу данных включались как клинические, так и эндоскопические находки. Все больные из данной группы обследовались в гастроэнтерологическом отделении ФГБНУ НЦЗД их лечащими врачами каждые 3 или 6 месяцев для выявления обострений, необходимости смены медикаментозной терапии или хирургического лечения.



Рис.2. Эндоскопическая система Fujinon EPX4400

Таблица 4. Эндоскопическая классификация ГЭРБ по G. Tytgat в модификации В.Ф. Приворотского.

Степень	**Изменения в пищеводе**
I степень	Умеренно выраженная очаговая эритема и/или рыхлость слизистой абдоминального отдела пищевода
II степень	То же + тотальная гиперемия, абдоминального отдела пищевода с очаговым фибринозным налетом и возможным появлением одиночных поверхностных эрозий, чаще линейной формы, располагающихся на верхушках складок слизистой
III степень	То же + распространение воспаления на грудной отдел пищевода. Множественные (иногда сливающиеся) эрозии, расположенные нециркулярно. Возможна повышенная контактная ранимость слизистой
IV степень	Язва пищевода. Синдром Барретта. Стеноз пищевода.

Таблица 5. Сиднейская эндоскопическая классификация гастритов.

Топография
- Панграстрит - Антральный гастрит - Гастрит тела желудка
Эндоскопические категории гастрита
- Эритематозный гастрит - Геморрагический гастрит - Рефлюкс гастрит - Гиперпластический гастрит - Наличие плоских эрозий - Наличие приподнятых эрозий

Обостерния заболевания оценивались по клинико-лабораторным показателям, которые характеризовались повышением содержания С-реактивного белка в крови и фекального кальпротектина в кале, наличию синдрома гемоколита, абдоминальных болей, снижения концетрации гемоглобина, и, подтверждались наличием воспалительных, эрозивных или язвенных изменений при эндоскопическом обследовании. Ни больные, ни лечащие врачи не знали о результатах ЗКЛЭМ, и решение о дальнейшем лечении пациентов принималось вне зависимости от полученных результатов.

Детям в данной группе выполнялось колоноскопическое исследование подвздошной кишки с эзофагогастродуоденоскопией для сравнения полученных эндомикроскопических результатов в подвздошной и двенадцатиперстной кишке.

В промежутке между госпитализациями больным, включенным в данную группу, было предложено связываться с лечащими врачами по

телефону или электронной почте, а также обследоваться у гастроэнтеролога по месту жительства.

Внутрипросветное исследование состояния слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у всех детей дополняли ЗКЛЭМ. Исследование выполняли с помощью конфокальной лазерной сканирующей системы Cellvizio® (Mauna Kea Technologies, Франция) зондами Gastroflex UHD. (рис. 3). Последние обеспечивают осмотр слизистой оболочки в пределах 240 мкм поля зрения и глубину изображения 55 мкм с разрешающей способностью 1 мкм. Перед проведением конфокальной эндомикроскопии осуществляли настройку оборудования в соответствии предписанием, выполнялась калибровка зонда.



Рис. 3. Конфокальная лазерная сканирующая система Cellvizio.

При идентификации патологической области проводили ее лазерное сканирование при помощи зонда, выдвигаемого через рабочий канал эндоскопа и аккуратно соприкасающегося со слизистой оболочкой. На экране рабочей станции появлялись черно-белые изображения со скоростью 12 кадров в секунду. Интерпретацию полученных изображений проводили по классификации Miami, разработанной для взрослых больных [24].

Данные для оценки барьерной функции тонкой кишки, полученные при ЗКЛЭМ двенадцатиперстной кишки, соотносили с результатами аналогичного исследования терминального отдела подвздошной кишки на наличие корреляционной взаимосвязи. Оценка и анализ конфокальных изображений осуществлялись совместно с профессором из университета Арканзаса (США) J.J. Liu, согласно предложенным ею критериям [65]:

1) Адекватно визуализирующаяся ворсина, т.е. видно не менее 75% ее общей поверхности на конфокальном изображении, в количестве не менее 3.

2) Подсчитывалось число отобранных таким образом зон на видео

3) Наличие патологически измененных зон

4) Четкая визуализация эпителиальных клеток на протяжении не менее 70% от общей длины видео.

5) Близость к илеоцекальному углу по присутствию в видео гистологической структуры толстой кишки.

Для определения плотности клеточных разрывов в каждой ворсине вручную рассчитывались эпителиальные клетки, разрывы в их структуре и максимальное значение числа разрывов для конкретного больного. Для каждого больного анализировалось от 3 до 10 ворсин. Плотность клеточных разрывов рассчитывалась как число разрывов на 1000 эпителиальных клеток, оцененных в адекватно визуализирующейся ворсине (пункт 1). Нормальной считали плотность менее 1%.

Группу контроля для оценки барьерной функции тонкой кишки составили 17 больных без заболевания тонкой или толстой кишки, нуждавшихся в проведении конфокальной эндомикроскопии для дифференциальной диагностики между гиперпластическими и аденоматозными полипами.

На основании полученных данных врач дополнял стандартное эндоскопическое заключение выявленными изменениями, полученными при проведении ЗКЛЭМ.

Зонды дезинфицировали в автоматических моющих машинах растворами в соответствии с правилами дезинфекции высокого уровня эндоскопов.

Для получения высококонтрастных эндомикроскопических изображений слизистой оболочки всем детям внутривенно вводили диагностическое средство - 10% раствор флуоресцеина натрия (Novartis, Юнинг, Франция) из расчета 5 мг на кг массы тела.

Наблюдательные исследования в старшей возрастной группе были одобрены локальным независимым этическим комитетом и ученым советом ФГБНУ НЦЗД.

Отсутствие аллергических реакций на препарат и нарушений функции печени и почек, минимальные побочные эффекты в группе детей старшей возрастной группы, явились основанием для разрешения к применению препарата у детей младшего школьного возраста.

Информированное согласие на проведение процедуры оформлялось в каждом конкретном наблюдении, и было получено у всех больных и их родителей. Больные без подписанного информированного согласия исключались из исследования.

Основными противопоказаниями к введению препарата являлись: почечная и печеночная недостаточность, аллергические реакции на лекарственные препараты в анамнезе.

Всех больных после внутривенного введения диагностического средства наблюдали с целью выявления побочных эффектов, которые разделяли на серьезные и незначительные. Серьезными считали осложнения, несущие угрозу для жизни и требующие медикаментозной коррекции. Все остальные побочные эффекты расценивали как незначительные. В ходе проведения процедуры проводили мониторинг (каждые 5 минут в ходе проведения исследования и каждые 15 минут в течение ближайших 2-х часов после манипуляции) витальных функций: пульсоксиметрия, измерение артериального давления, электрокардиография, термометрия (монитор фирмы Datex Ohmeda Cardiocap 5, Дания).

Временной промежуток, необходимый для проведения эндоскопического исследования с ЗКЛЭМ, увеличивался до 20-30 минут, что являлось необходимым условием выполнения этих манипуляций под общим обезболиванием севофлураном по стандартной методике. Мониторинг пациента продолжали в течение 2-х часов после введения препарата в палате пробуждения эндоскопического отделения по вышеприведенной схеме.

Перед переводом пациента в профильное отделение, лечащий врач отмечал наличие или отсутствие каких-либо побочных эффектов.

После выписки больного родителям предлагали самостоятельно отмечать побочные эффекты в течение одного месяца после проведения процедуры. Критерии для побочных эффектов включали любые системные аллергические реакции, сыпь, зуд, затрудненное дыхание, хрипы и другие симптомы, на которые предъявлял жалобы пациент или его родители.

Видеоэндоскопию с ЗКЛЭМ дополняли биопсией слизистой оболочки с последующим гистологическим исследованием у всех детей. Стандартные стерильные биопсийные щипцы подводили к слизистой оболочке исследуемого органа через рабочий канал эндоскопа.

Материал для гистологического исследования получали по следующей методике. После проведения конфокальной лазерной эндомикроскопии забор материала производили по 1 фрагменту из различных отделов пищевода, желудка или двенадцатиперстной кишки, в зависимости от характера и распространенности выявленных воспалительных изменений.

Гистологическое исследование биоптатов и удаленных полипов выполняли в патологоанатомической лаборатории ФГБНУ НЦЗД (зав. - д.м.н., проф. А.Г. Талалаев). Все биоптаты фиксировали в 10% растворе формалина, делали традиционные гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином-эозином и проводили PAS-реакцию. Выявленные изменения оценивали согласно общепринятым гистологическим критериям, выделяя активность воспаления, желудочную или кишечную метаплазию, фиксировали наличие эрозий, язв и полипозных образований слизистой оболочки ВОПТ. Гистологическую картину целиакии оценивали по классификации Marsh (табл. 6).

Таблица 6. Гистологическая классификация целиакии по Marsh.

Стадия	**Гистологические изменения**
Marsh I	Повышенная инфильтрация эпителия ворсинок межэпителиальными лимфоцитами
Marsh II	Повышенная инфильтрация эпителия ворсинок межэпителиальными лимфоцитами + гиперплазия крипт
Marsh IIIA	Частичная атрофия ворсинок + гиперплазия крипт
Marsh IIIB	Субтотальная атрофия ворсинок + гиперплазия крипт
Marsh IIIC	Тотальная атрофия ворсинок + гиперплазия крипт

Полиповидные образования в зоне пищеводно-желудочного перехода и в желудке оценивались с помощью международной эндоскопической классификации полипов, принятой в Стокгольме в 1982г. [50], согласно которой дополнительно выделяли полипы диаметром до 5мм и свыше 5мм.

Дифференциальную диагностику между гиперпластическим и аденоматозным полипами выполняли с помощью ЗКЛЭМ. Гиперпластические полипы оставляли *in situ* для дальнейшего наблюдения в динамике, аденоматозные полипы подвергали эндоскопической электроэксцизии.

Полипэктомию выполняли в эндоскопическом операционном кабинете 10 детям. При помощи конфокальной лазерной эндомикроскопии четко определялась граница измененной ткани слизистой оболочки полипа. Непосредственно перед полипэктомией в подслизистый слой с помощью эндоскопического инъектора вводили 5 мл новокаин-адреналинового раствора для создания так называемой “подушки”, что позволяло снизить до минимума риск таких осложнений, как кровотечение и перфорация. После того, как “подушка” была создана, через рабочий канал эндоскопа к основанию полипа подводили диатермическую петлю и умеренно ее затягивали. Приподнимая полиповидное образование над окружающей слизистой оболочкой, убедившись, что полип не соприкасается с противоположной стенкой, производили подачу электрического тока в импульсном режиме до появления видимой коагуляции. В режиме продолжительной коагуляции полип отделяли от окружающей слизистой оболчки до полного затягивания петли. Удаленный полип захватывали эндоскопической “корзинкой” или щипцами типа “трезубец” для последующего гистологического исследования.

Показания и отбор детей к хирургическому лечению производили согласно осложнениям гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) – наличие пищевода Барретта, грыжи пищеводного отверстия диафрагмы, неэффективности медикаментозной терапии, стриктуры пищевода и другие. Прерогативой хирургического лечения у всех детей в данной группе, являлась лапароскопическая фундопликация по Ниссену. Предоперационная подготовка включала комплекс мероприятий,

направленных на медикаментозную коррекцию моторно-эвакуаторной, секреторной функции пищевода и желудка.

По результатам клинико-эндоскопических, конфокальных и гистологических методов исследования 29 детям с ГЭРБ было показано оперативное вмешательство.

В случаях наличия пептического стеноза отмечавшегося у 5 детей из этой группы, выполняли бужирование по струне или баллонную дилатацию для восстановления просвета пищевода (баллоны CRE M00558350 производства Boston Scientific, Natick, USA).

Эндоскопическая полипэктомия образований пищеводно-желудочного перехода и желудка свыше 5мм у 10 детей выполнялась в зависимости от результатов ЗКЛЭМ и предшествовала лапароскопической фундопликации по Ниссену у нуждавшихся в оперативном лечении больных.

Лапароскопическая фундопликация по Ниссену была успешно выполнена всем 29 детям. Все вмешательства прошли без осложнений.

Продолжительность периода наблюдения после операции колебалась от 6 до 15 месяцев и в среднем составила 9,7 ± 3,0 месяца. Всем больным назначались контрольные плановые ЭГДС спустя 1, 3 и 6 месяцев после оперативного лечения и далее каждый год для оценки замыкательной функции нижнего пищеводного сфинктера и наличия эндоскопических признаков рефлюкс-эзофагита. Дополнительно в период спустя 6 месяцев после операции вместе с контрольной ЭГДС выполнялась ЗКЛЭМ с биопсией слизистой оболочки пищевода и последующим гистологическим исследованием.

Статистический анализ результатов исследования выполнен на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel 2012 (Microsoft Corp., США) и программного обеспечения для статистического анализа данных SPSS 16.0 (SPSS, Чикаго, США) и STATA (StataCorp LP, College Station, Texac, США). Была рассчитана

чувствительность, специфичность, точность, ложноположительный и ложноотрицательный прогностический результат метода ЗКЛЭМ по отношению к “золотому стандарту” – гистологическому исследованию. Для выявления корреляционной взаимосвязи между гистологическим исследованием и ЗКЛЭМ был использован коэффициент корреляции Спирмена.

Для статистического анализа нарушения барьерной функции тонкой кишки и его связи с обострением у больных с ВЗК основным методом оценки были кривые выживаемости Каплана-Мейера, а для сравнения между больными с нормальным и повышенным числом разрывов щеточной каймы был использован логарифмический ранговый критерий. Для оценки плотности клеточных разрывов как предиктора риска клинических обострений использовалась модель пропорциональных рисков Кокса. Двустороннее значение p менее 0,05 свидетельствовало о значимости полученных показателей.

Для сравнения результатов ЗКЛЭМ, полученных при обследовании подвздошной и двенадцатиперстной кишки, был использован коэффициент корреляции Спирмена.

Сильной считалась корреляционная связь при коэффициенте от 1 до 0,7, средней - от 0,699 до 0,3, слабой - от 0,299 до 0.

ГЛАВА 3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ ПРИ ВНУТРИПРОСВЕТНОМ ИССЛЕДОВАНИИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ.

Клиническая симптоматика гастроэнтерологических проявлений болезни отличалась скудностью жалоб, не всегда носила определенный характер, протекала под маской семиотики клинически подтвержденного диагноза профильного заболевания.

Ведущую роль среди клинических проявлений ГЭРБ у всех детей имели болевой синдром с преимущественной локализацией за грудиной, диспепсический синдром, изжога, регургитация желудочного содержимого, отрыжка воздухом и/или пищей, ощущение кислоты и/или горечи во рту, ощущение боли за грудиной, дисфагия, икота.

ВЗК сопровождались абдоминальным болевым синдромом, диареей, примесью слизи, гноя и крови в фекалиях, субфебрильной температурой, истощением больного, тахикардией.

Хронический гастродуоденит и язвенная болезнь желудка и/или двенадцатиперстной кишки чаще носили малосимптомное клиническое течение, тогда как патологическая семиотика с “голодными” болями в эпигастрии, приступообразными, иногда с иррадиацией в спину и/или поясницу, или ноющими, с улучшением самочувствия после приема пищи, встречалась в 1 случае (0,9%).

Полиповидные образования клинически не проявлялись ни у одного ребенка, и являлись эндоскопической находкой.

Клинические симптомы при целиакии были малочисленные, среди которых основными следовало признать диспепсию в виде расстройства стула и вздутия живота.

Все вышеперечисленные симптомы явились показанием для проведения эндоскопического исследования верхнего отдела пищеварительного тракта и после подписания информационного согласия

и беседы с родителями эзофагогастродуоденоскопия, дополненная конфокальной лазерной эндомикроскопией и прицельной биопсией слизистой оболочки пищевода, желудка или двенадцатиперстной кишки была выполнена у всех детей.

3.1. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки пищевода у детей

Из общего количества обследованных детей ГЭРБ с эзофагитом I степени по классификации G.Tytgat в модификации В.Ф. Приворотского наблюдалась у 11 (9,4%) пациентов , II - у 14 (12,1%), III - у 6 (5,2%), IV - у 16 (13,8%). Неизменную слизистую оболочку пищевода при ЭГДС ВОПТ выявлялась в 69 случаях (59,4%).

При традиционном эндоскопическом исследовании в белом свете картина неизмененной слизистой оболочки пищевода была представлена бледно-розовой слизистой оболочкой с четким сосудистым рисунком на протяжении всей длинны пищевода, отсутствием в просвете примеси желчи (рис. 4А).

Эзофагит I степени отличался умеренно выраженным очаговым воспалением и/или рыхлостью слизистой оболочки нижней трети пищевода (рис 5А).

При эзофагите II степени наблюдалась диффузная гиперемия нижней трети пищевода с единичными поверхностными линейными эрозиями размером до 2 мм.

Для эзофагита III степени было характерным наличие диффузной гиперемии средней и нижней трети пищевода и наличие множественных линейных эрозий (рис. 6А).

Эзофагит IV степени (пищевод Барретта) сопровождался появлением участков отличающихся от окружающей слизистой оболочки, ее изъязвлением, гиперемией по типу “языков пламени” (рис. 7А).

По данным зондовой конфокальной эндомикроскопии эзофагит наблюдался у 40 детей (34,4%), желудочная метаплазия - у 7 детей (6,0%), кишечная метаплазия - у 17 (14,6%). Неизмененная эндомикроскопическая слизистая оболочка пищевода выявлялась у 41 (35,3%) больного. У 11 (9,7%) детей по различным причинам (технические неполадки в работе конфокального лазерного микроскопа, зонда или компьютерного оборудования) ЗКЛЭМ пищевода не проводили.

Конфокальная эндомикроскопия неизмененной слизистой оболочки пищевода показала клетки плоского эпителия (“сквамозного”, похожего на чешую) без ворсин или крипт и светло окрашенные капиллярные кольца (рис. 4В).

При воспалительных изменениях слизистой оболочки пищевода наблюдали нарушение четкости структуры клеток плоского эпителия, усиление сосудистого рисунка с расширенными сосудами с замедленным кровотоком и полиморфноклеточной инфильтрацией (рис. 5В).

Изображениям желудочной метаплазии соответствовал цилиндрический эпителий с круглыми и дифференцированными желудочными железами, и воспаленными, расширенными кровеносными сосудами (рис. 6В).

Пищевод Барретта был представлен ворсиноподобными структурами с регулярным цилиндрическим эпителием и окрашенными темным бокаловидными клетками (рис. 7В). Такие осложнения, как желудочная и кишечная метаплазия, наблюдали у 24 детей (20,6%) с длительно текущей и рецидивирующей ГЭРБ.

Гистологическая картина эзофагита была выявлена у 36 детей (31,0%), желудочной метаплазии у - 8 детей (6,9%), кишечной - у 18 (15,4%). Микроскопически неизмененную слизистую оболочку наблюдали в 43 (37,0%) случаях. У 11 (9,7%) детей гистологическое исследование пищевода не выполнялось (из-за технических неполадок в работе конфокального лазерного микроскопа, зонда или компьютерного оборудования).

Гистологическое исследование биоптатов неизмененной слизистой оболочки пищевода показало многослойный плоский (“сквамозный”) эпителий со слизистыми железами (рис. 4С).

Воспалительные изменения слизистой оболочки пищевода сопровождались отеком слизистой оболочки и ее капилляров (“сосудистые озерца”), нарастанием полиморфно-клеточной инфильтрации (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы в количестве более 6 на биоптат), обнаружением поверхностных эрозий, баллонной дистрофией клеток (рис. 5С).

Желудочная метаплазия характеризовалась дифференцированной желудочной тканью с секретирующими слизь цилиндрическими клетками, главными и париетальными клетками (рис. 6С).

Пищевод Барретта проявлялся присутствием железистого эпителия с бокаловидными клетками (рис. 7С).

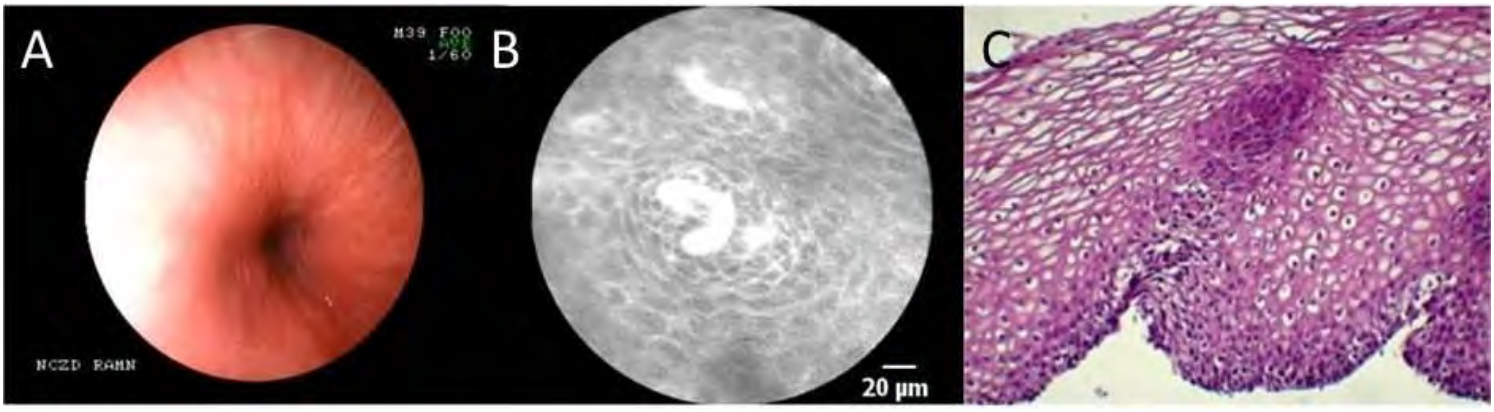


Рис. 4. Эндоскопическое (А), эндомикроскопическое (В) и гистологическое (С) изображения неизмененной слизистой оболочки пищевода

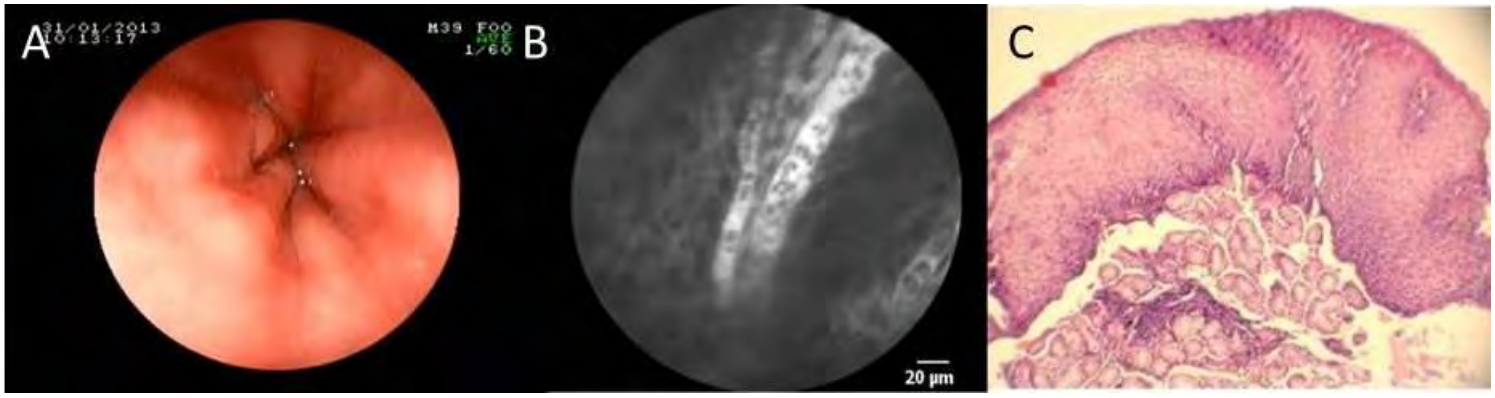


Рис. 5. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения воспалительных изменений слизистой оболочки пищевода.

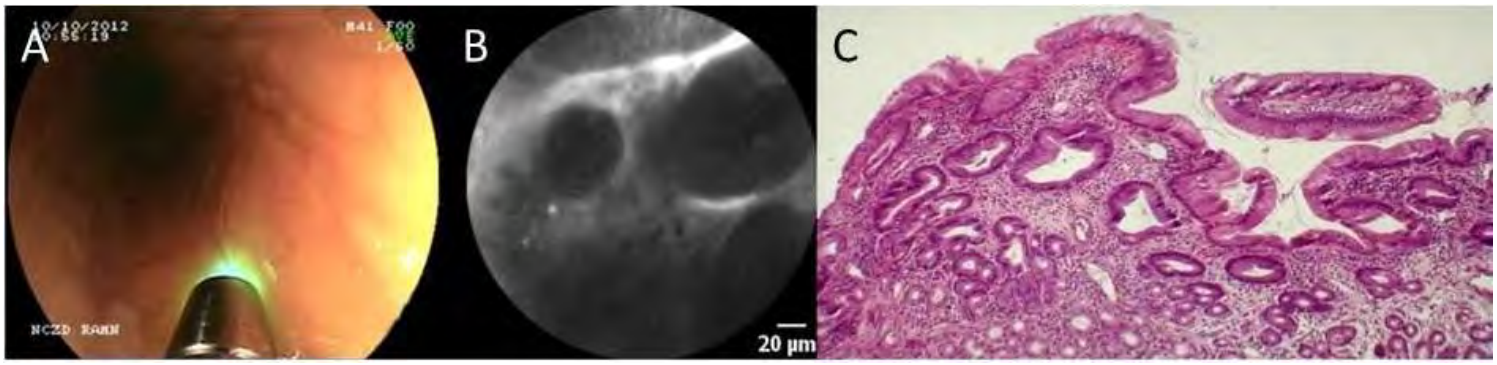


Рис. 6. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения желудочной метаплазии слизистой оболочки пищевода.

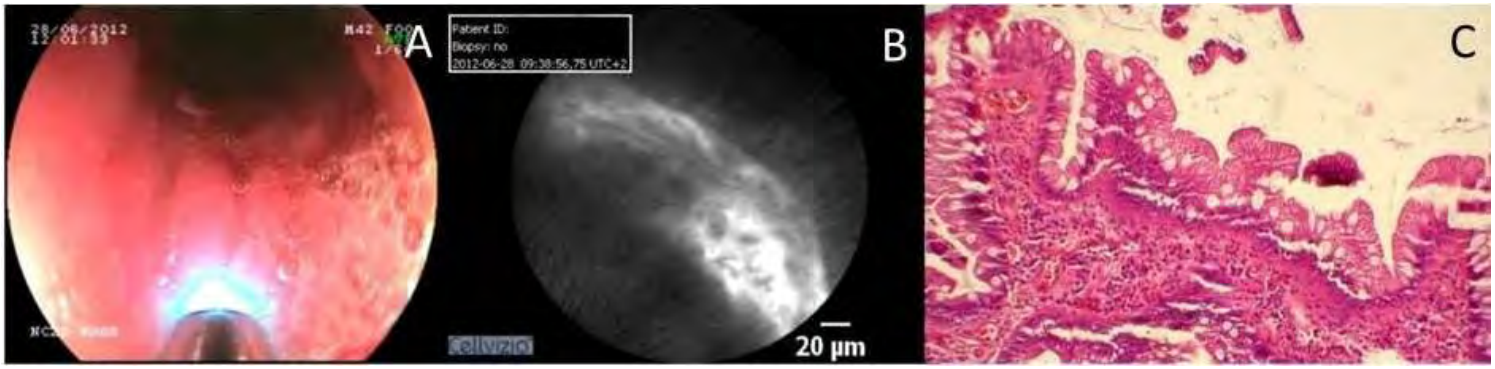


Рис. 7. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения пищевода Барретта.

Из представленных в таблице 7 данных следует, что на основании эндоскопического исследования в качестве единственного метода диагностики нельзя дифференцировать такие состояния как желудочная метаплазия и пищевод Барретта. В то же время оптическая биопсия, проводимая непосредственно во время исследования, помогает нивелировать данный недостаток эндоскопии и различать неизменную слизистую оболочку пищевода от воспаленной, желудочной или кишечной метаплазии, а ее результаты тесно связаны с результатами гистологического исследования.

Таблица 7. Результаты макроскопической, эндомикроскопической и гистологической оценки состояния слизистой оболочки пищевода у детей

Метод исследования	**Эзофагит**				**ЖМ**	**ПБ**	**Норма**	**Не выполнено**	**Всего**
Эндоскопия	I	II	III	IV	-	-	69 (59,5%)	-	116 (100%)
	11 (9,4%)	14 (12,1%)	6 (5,2%)	16 (13,8%)					
ЗКЛЭМ	40 (34,4%)				7 (6,0%)	17 (14,6%)	41 (35,3%)	11 (9,7%)	116 (100%)
Гистология	36 (31,0%)				8 (6,9%)	18 (15,4%)	43 (37,0%)	11 (9,7%)	116 (100%)

ЖМ – желудочная метаплазия, ПБ – пищевод Барретта

3.2. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки желудка у детей.

Результаты сравнительной оценки состояния слизистой оболочки желудка у детей представлены в таблице 8.

В данной работе, в соответствии с Сиднейской классификацией гастритов, у 116 обследованных детей при помощи ЭГДС было диагностировано два типа гастритов: эритематозный - у 23 пациентов (19,8%), рефлюкс-гастрит был выявлен у 44 больных (37,9%). Данная патология сопровождалась язвами желудка или двенадцатиперстной кишки в 9 случаях (7,7%), неизмененная слизистая оболочка была выявлена у 49 (42,3%) детей. В десяти (8,6%) случаях по различным причинам (технические неполадки в работе конфокального лазерного микроскопа, зонда или компьютерного оборудования) при выполнении ЭГДС не удалось выполнить оптическую биопсию с гистологическим исследованием слизистой оболочки.

Эндоскопическая картина неизмененной слизистой оболочки желудка была представлена бледно-розовой, блестящей слизистой оболочкой, гладкой в антральном отделе, наличием прозрачной слизи, эластичными складками, легко расправляющимися при инсуффляции воздуха (рис. 8А). На эритематозный гастрит указывала мелкоочаговая или крупноочаговая гиперемия слизистой оболочки в фундальном или антральном отделах, отечность складок, наличие мутной слизи в просвете желудка (рис. 9А). Рефлюкс-гастрит, помимо выше перечисленных признаков, характеризовался наличием примеси зеленой желчи в слизистом озерце и недостаточным смыканием привратника. Нередко вышеописанная эндоскопическая семиотика сочеталась с различной степенью воспалительных изменений в пищеводе.

Гастрит методом конфокальной лазерной эндомикроскопии был диагностирован в 66 случаях (56,9 %). Нормальная эндомикроскопическая

структура слизистой оболочки желудка у 40 больных (34,5%). Десяти детям (8,6%) ЗКЛЭМ в области желудка не проводилась.

Эндомикроскопическое изображение фундального и антрального отделов желудка различается, поэтому оптическая биопсия неизмененной слизистой оболочки фундального отдела показала регулярные округлые железы (рис. 8B), в то время как в антральном отделе железы приобретали вид “булыжной мостовой”. О неизмененной слизистой желудка также говорило наличие регулярно расположенных, слегка изогнутых или прямых кровеносных сосудов, окружающих крипты. Гастрит сопровождался увеличением флюоресценции (яркости) в строме, атрофией желез, иногда удвоением крипт, присутствием полиморфноклеточного инфильтрата в промежутках между криптами (рис. 9B).

По результатам гистологического исследования гастрит обнаружился у 74 больных (63,8%), неизмененная слизистая оболочка - у 32 пациентов (27,6%). Десяти детям (8,6%) гистологическое исследование желудка не проводилось.

Неизмененная слизистая оболочка желудка на гистологических срезах фундального отдела характеризовалась наличием однослойного плоского эпителия, регулярно расположенных фундальных желез, округлой формы, с париетальными и главными клетками, в то время как железы в антральном отделе располагались реже и имели более широкий просвет (рис. 8C). При гастрите наблюдалось наличие расширенных капилляров, отек собственной пластинки, ограниченное воспаление, скопления нейтрофилов и фибрина, иногда наблюдались интраэпителиальные микроэрозии (рис. 9C).

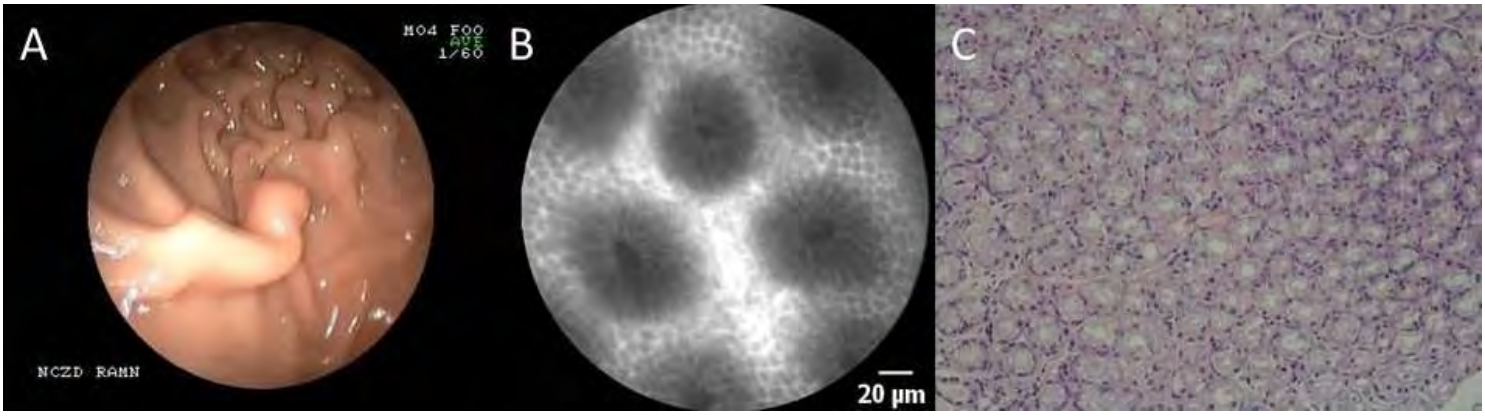


Рис. 8. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения неизменной слизистой оболочки желудка.

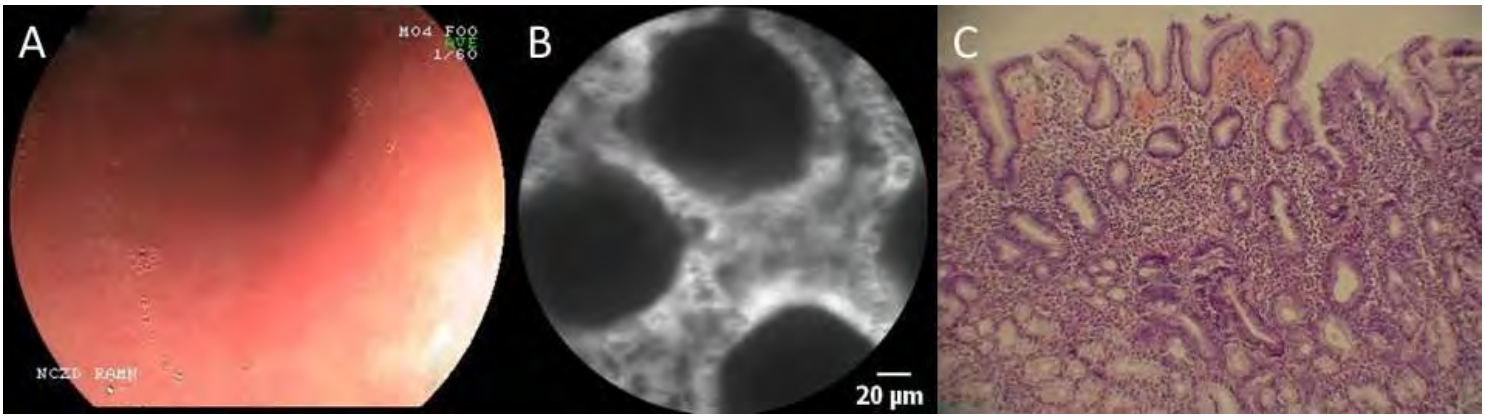


Рис. 9. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения гастрита.

Таблица 8. Частота выявления изменений слизистой оболочки желудка у детей при макроскопической, эндомикроскопической и гистологической оценке

Разновидность изменений в желудке	Эндоскопия	ЗКЛЭМ	Гистология
Гастрит	67 (57,8%)	66 (56,9%)	74 (63,8%)
Без изменений	49 (42,2%)	40 (34,5%)	32 (27,65)
Не выполнено	-	10 (8,6%)	10 (8,6%)
Всего	116 (100%)	116 (100%)	116 (100%)

3.3. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка полипов пищеводно-желудочного перехода и желудка у детей.

Полиповидные образования ВОПТ встречались в 26 случаях (22,4%), сопровождались отсутствием клинических проявлений заболевания, и, как правило, являлись случайной находкой, чаще локализуясь в пищеводе и желудке.

Полиповидные образования пищеводно-желудочного перехода и желудка были обнаружены у 26 детей (22,4%). При этом очаговая гиперплазия утолщенной складки кардии и полипы менее 5 мм в диаметре были выявлены у 10 (8,6%) детей, более 5 мм в диаметре - у 16 (13,7%) больных.

По локализации в 21 случае (80,7%) полиповидное образование находилось в области кардио-эзофагеального перехода, а в 5 случаях (19,3%) - в желудке. Эндоскопически все образования были классифицированы как полипы на широком основании. В данной серии наблюдений полипы на ножке и “сидячие” полипы не встречались.

Макроскопическая картина полиповидных образований характеризовалась их округлой формой с гладкой поверхностью, по цвету не отличающейся от цвета окружающей слизистой оболочкой (рис. 10А). В 12 случаев (10,3%) встречались полипы с признаками гиперемии, с эрозированной верхушкой или налетом фибрина, имеющие ячеистую поверхность (рис. 11А).

Дифференциальную диагностику полиповидных образований ВОПТ с помощью ЗКЛЭМ проводили в режиме реального времени. В 17 случаях (14,6%) выявлялись гиперпластические и в 9 случаях (7,7 %) - аденоматозные полипы.

Гиперпластические полипы характеризовались узким, щелевидным или звездчатой формы просветом крипт, регулярностью крипт и эпителия, уменьшенными в диаметре сосудами (рис. 10В). При аденоматозных полипах

наблюдались ворсиноподобные структуры неправильной формы, темный, нерегулярно утолщенный эпителий и окрашенные темным бокаловидные клетки (рис. 11В).

При гистологическом исследовании диагноз гиперпластического полипа был верифицирован в 16 (13,7%) случаях, аденоматозного - в 10 (8,6%) случаях.

Гиперпластические полипы при гистологическом исследовании характеризовались отечной собственной пластинкой со смешенным воспалительным инфильтратом, заметным удлинением крипт, ветвлением и кистозными расширениями ямок (рис 10С). В препаратах аденоматозных полипов наблюдались фрагменты железистой ткани и ворсинчатые образования, выстланные высоким цилиндрическим эпителием, в собственной пластинке – слабо выраженную лимфо-плазмоцитарную инфильтрацию (рис. 11С). Ни в одном из представленных препаратов диспластических изменений выявлено не было.

Из представленных в таблице 9 данных следует, что эндоскопический метод исследования не позволяет дифференцировать гиперпластические и аденоматозные полипы, оценивая лишь их размеры.

Таблица 9. Результаты макроскопической, эндомикроскопической и гистологической оценки полипов пищевода и желудка у детей

Метод исследования	Полипы				Всего полипов
	< 5мм	> 5мм	Гиперпластические	Аденоматозные	
Эндоскопия	10 (8,6%)*	16 (13,7%)	-	-	26
ЗКЛЭМ	-	-	17 (14,6%)	9 (7,7 %)	26
Гистология	-	-	16 (13,7%)	10 (8,6%)	26

*% указаны от общего числа обследованных детей

Оптическая биопсия непосредственно во время обследования помогла установить структуру полипа, а результаты зондовой КЛЭМ практически полностью совпадали с результатами гистологического исследования, что позволяет проводить их одномоментную диагностику и удаление.

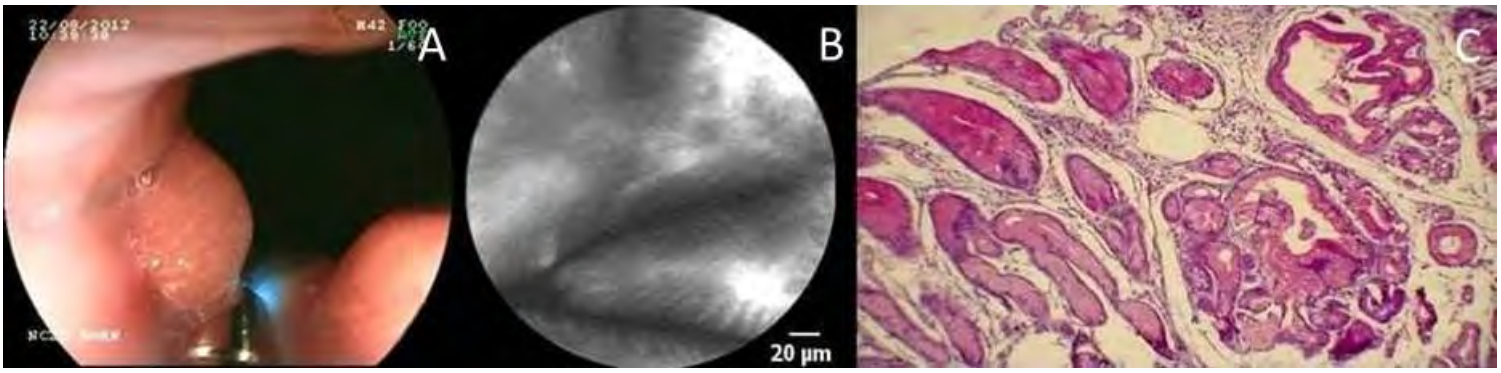


Рис. 10. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения гиперпластического полипа.

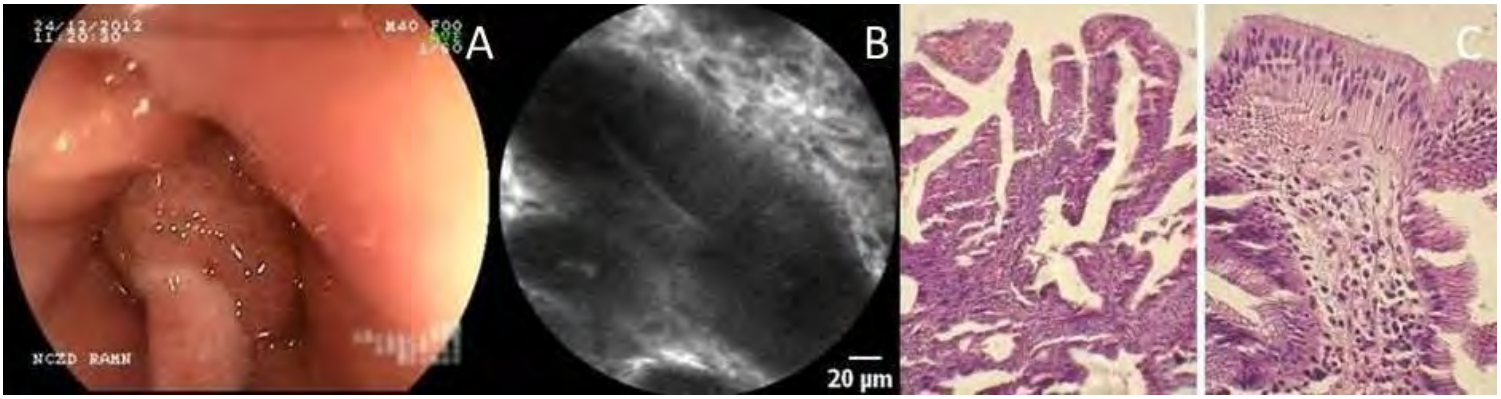


Рис. 11. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения аденоматозного полипа.

3.4. Макроскопическая, эндомикроскопическая и гистологическая оценка состояния слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей.

Результаты сравнительной оценки состояния слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей представлены в таблице 10.

Из общего числа обследованных детей при традиционном эндоскопическом исследовании в белом свете неизмененную слизистую оболочку визуализировали у 61 ребёнка (52,5%), дуоденит был выявлен у 55 больных (47,5%), при этом изменения, характерные для целиакии, наблюдалась у 2 пациентов (1,7%).

Таблица 10. Частота выявления изменений слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки у детей при макроскопической, эндомикроскопической и гистологической оценке

Разновидность изменений в ДПК	Эндоскопия	ЗКЛЭМ	Гистология
Дуоденит	55 (47,5%)	66 (57,0%)	68 (58,6%)
Без изменений	61 (52,5%)	35 (30,2%)	33 (28,5%)
Не выполнено	-	15 (12,9%)	15 (12,9%)
Всего	116 (100%)	116 (100%)	116 (100%)
Целиакия	2 (1,7%)	2 (1,7%)	2 (1,7%)

По различным причинам (технические неполадки в работе конфокального лазерного микроскопа, зонда или компьютерного оборудования) у 15 (12,8%) детей при выполнении ЭГДС не удалось выполнить оптическую биопсию с гистологическим исследованием слизистой оболочки.

Эндоскопическая картина неизмененной слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки характеризовалась бледно-розовой её окраской, эластичными складками, легко расправляющимися при инсуффляции воздухом, с подчеркнутым ворсинчатым слоем (Рис. 12А).

Эндоскопически визуализируемые изменения, указывающие на дуоденит, характеризовались наличием очаговой или диффузной гиперемии, отечностью складок (Рис. 13А), наличием эрозий или язвенных дефектов, особенно у больных с болезнью Крона и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Целиакия была представлена поперечной исчерченностью слизистой оболочки, снижением высоты ворсинчатого слоя, вплоть до участков с полным его отсутствием (Рис. 14А).

При помощи оптической биопсии неизмененная слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки была выявлена у 35 больных (30,2%), дуоденит - у 66 пациентов (57,0%), в том числе целиакия - у 2 больных (1,7%).

15 детям (12,8%) ЗКЛЭМ двенадцатиперстной кишки не проводилась.

Конфокальные изображения неизмененной слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки харатеризовались регулярно расположенными, пальцевидной или листовидной формы, ворсинами с темными бокаловидными клетками, расположенными между энтероцитами (Рис. 12В). При дуоденитах наблюдалась деформация ворсин, наличие полиморфноклеточного инфильтрата и расширенных и извитых кровеносных сосудов с замедленной скоростью кровотока (Рис. 13В). Тяжелая форма целиакии на изображениях оптической биопсии характеризовалась полной атрофией ворсин, появлением в поле зрения крипт, просветы которых опоясывали энтероциты. Наблюдалось усиление лимфоцитарной инфильтрации (Рис. 14В).

Гистологически неизмененная слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки верифицировалась у 33 (28,5%) больных и характеризовалась регулярной структурой кишечных ворсин, высота которых в 5 раз превышала глубину крипт (Рис. 12С). Дуоденит - у 68 (58,6%) пациентов, среди них целиакия - у 2 детей (1,7%). Дуоденит сопровождался инфильтрацией собственной пластинки и эпителиального слоя нейтрофилами, лимфоцитами и плазматическими клетками (Рис. 13С). На целиакию при гистологическом

исследовании указывало полное отсутствие кишечных ворсин и глубокие крипты (рис. 14C).

В 15 случаях (12,9%) гистологическое исследование двенадцатиперстной кишки не выполнялось.

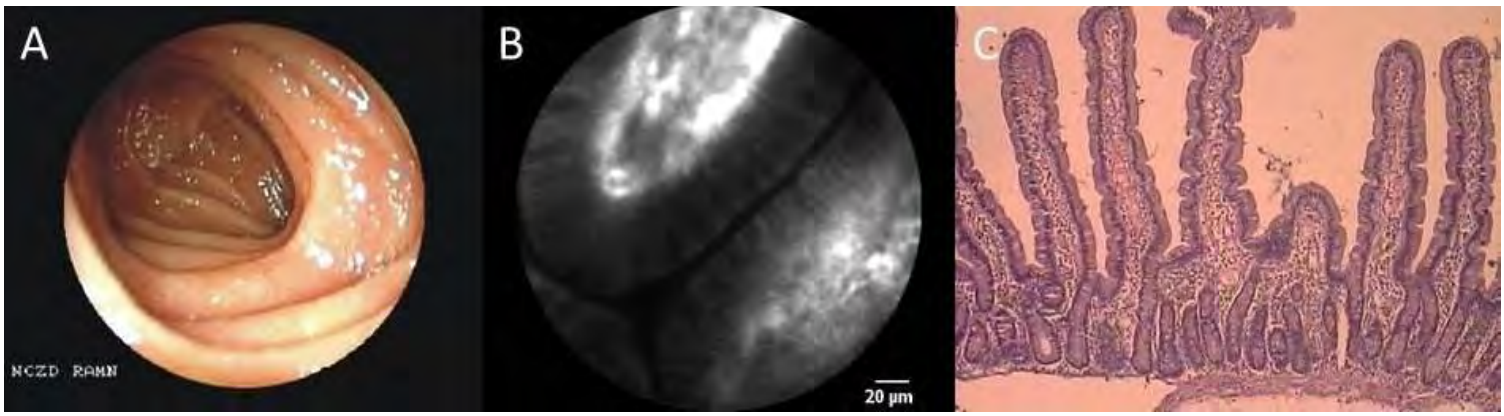


Рис. 12. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения неизмененной слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки.

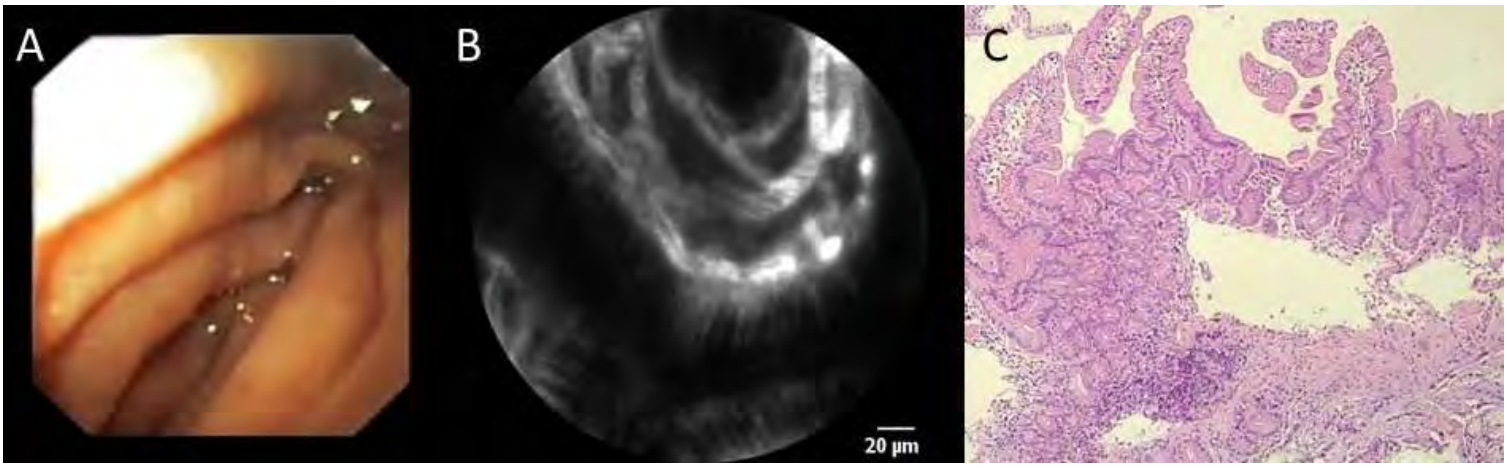


Рис. 13. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения дуоденита.

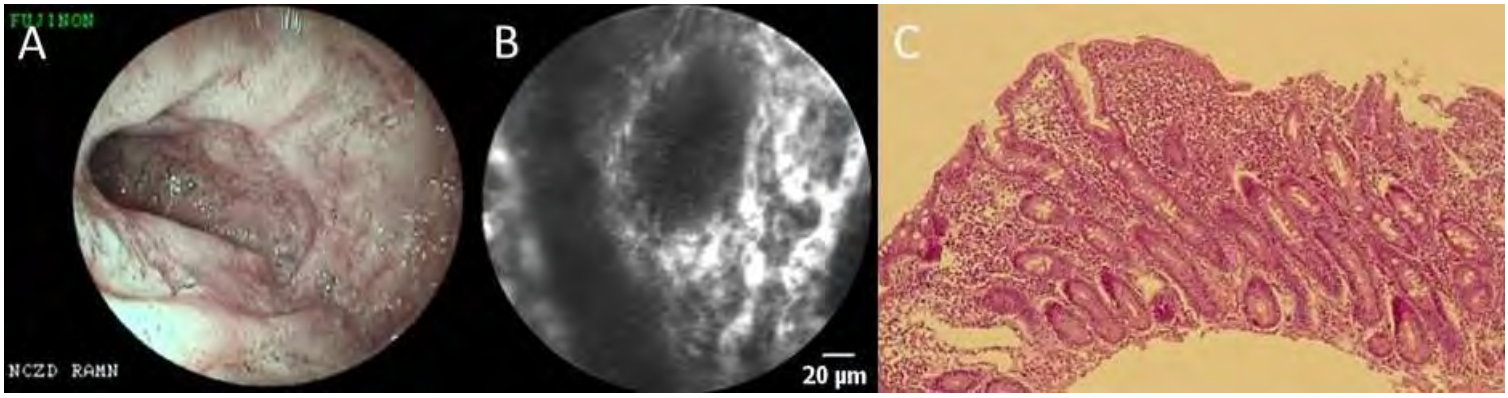


Рис. 14. Эндоскопическое (A), эндомикроскопическое (B) и гистологическое (C) изображения целиакии.

3.5. Сравнительная оценка эндомикроскопических и гистологических методов исследования состояния слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей.

С целью определения прогностической значимости метода ЗКЛЭМ в оценке неизмененной и патологически измененной структуры слизистой оболочки ВОПТ были сопоставлены результаты оптической биопсии с данными, полученными при проведении стандартного гистологического исследования. В результате сравнительного анализа была рассчитана чувствительность, специфичность и точность, конфокальной эндомикроскопии в диагностике воспалительных и метапластических изменений слизистой оболочки ВОПТ, гиперпластического или аденоматозного генеза полиповидных образований пищеварительного тракта у детей (таблица 11).

Таблица 11. Сравнительная оценка макроскопических, эндомикроскопичеких и гистологических методов исследования состояния слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей

Патология	Чувствительность	Специфичность	ППЦ	ОПЦ	Точность	*Rs* (значение p)
Эзофагиты	88,8%	88,3%	86,4%	90,4%	88,6%	0,79 (p=0,001)
Метаплазии пищевода	92,3%	95,3%	100%	95,3%	94,2%	0,85 (p=0,001)
Полипы ВОПТ	92,4%	95,2%	-	-	-	0,95 (p=0,001)
Гастриты	83,7%	87,5%	93,9%	70,0%	84,9%	0,67 (p=0,001)
Дуодениты	86,7%	81,8%	90,7%	75,0%	85,1%	0,67 (p=0,001)

ППЦ – положительная прогностическая ценность, ОПЦ – отрицательная прогностическая ценность, Rs – коэффициент корреляции Спирмена

При сопоставлении ЗКЛЭМ с гистологическим методом исследования, считающимся «золотым стандартом» в диагностике эзофагитов, эндомикроскопия показала чувствительность 88,8%, специфичность 88,3%, положительную прогностическую ценность 86,4%, отрицательную прогностическую ценность 90,4% и точность 88,6%, а коэффициент корреляции Спирмена составил 0,79 (p=0,001).

При метапластических изменениях пищевода (желудочная метаплазия и ПБ) чувствительность ЗКЛЭМ составила 92,3%, специфичность 95,3%, положительная прогностическая ценность 100%, отрицательная прогностическая ценность 95,3%, точность 94,2%. Коэффициент корреляции составил 0,85 (p=0,001).

В дифференциальной диагностике полипов пищеводно-желудочного перехода и желудка оптическая биопсия показала чувствительность 92,4%, специфичность 95,2%, а коэффициент корреляции составил 0,95 (p=0,001).

Чувствительность ЗКЛЭМ в диагностике гастритов составила 83,7%, специфичность 87,5%, положительная прогностическая ценность 93,9%, отрицательная прогностическая значимость 70,0%, точность 84,9% и коэффициентом корреляции с “золотым стандартом” 0,67 (p=0,001).

При сравнении результатов оптической биопсии и гистологического исследования чувствительность в диагностике дуоденитов составила 86,7%, специфичность 81,8%, положительная прогностическая ценность 90,7%, отрицательная прогностическая ценность 75,0%, точность 85,1% с коэффициентом корреляции Спирмена 0,67 (p=0,001).

Таким образом, ЗКЛЭМ в диагностике эзофагитов, метапластических изменений слизистой оболочки пищевода, дифференциальной диагностике полиповидных образований пищеводно-желудочного перехода и желудка продемонстрировала сильные прямые корреляционные зависимости с высоким уровнем статистической значимости. При гастритах и дуоденитах корреляционная взаимосвязь была расценена как средняя, а уровень значимости также остался высоким.

3.6. Зондовая конфокальная лазерная эндомикроскопия в оценке барьерной функции тонкой кишки у детей.

Барьерная функция тонкой кишки с помощью ЗКЛЭМ была количественно оценена у 41 ребенка, из которых 24 (58,5%) пациента имели гистологически подтвержденный диагноз ВЗК. Группу контроля составили 17 больных без заболевания тонкой или толстой кишки, нуждавшихся в конфокальной эндомикроскопии для дифференциальной диагностики между гиперпластическими и аденоматозными полипами.

Клинико-эндоскопическая характеристика изменений слизистой оболочки пищеварительного тракта детей с ВЗК представлена в таб. 12.

Таблица 12. Клинико-эндоскопическая характеристика изменений слизистой оболочки пищеварительного тракта больных с ВЗК

Базовые характеристики пациентов	Болезнь Крона (n=13)	Язвенный колит (n=11)
Средний возраст (годы)	14 ± 3,3	14 ± 3,2
% мальчиков	38	55
Средняя длительность болезни (лет)	2,9	2,9
Эндоскопическая локализация изменений слизистой оболочки (%)		
Подвздошная	2 (15)	-
Подвздошно-толстокишечная	9 (70)	-
Толстокишечная	2 (15)	-
Панколит	-	7 (64)
Левосторонняя / проктит	-	4 (36)
Эндоскопическая тяжесть заболевания (%)		
Ремиссия	4 (31)	2 (18)
Легкая	2 (15)	7 (64)
Средняя	0 (0)	2 (18)
Тяжелая	7 (54)	-
Медикаментозная терапия (%)		
Без терапии	-	1 (9)
Аминосалицилаты	4 (31)	8 (73)
Стероиды	1 (8)	1 (9)
Анти ФНО-α	5 (38)	1 (9)
Смешанная терапия	3 (23)	-
С-реактивный белок (среднее)	18	3

Было обследовано 24 ребенка с ВЗК – 13 детей с БК и 11 пациентов с ЯК: 13 девочек (54%) и 11 мальчиков (46%) в возрасте от 10 до 18 лет (средний возраст 14,0±3,3лет). Период наблюдения составил от 4 до 33 месяцев (13±8,2 месяца) Средняя продолжительность болезни к моменту проведения ЗКЛЭМ составила 2,9±1,8 лет. За этот период наблюдения у 9 (38%) больных наблюдалось обострение воспалительных изменений кишки умеренной или высокой степени активности.

У 13 детей этой группы (9 БК, 4 ЯК) была рассчитана плотность клеточных разрывов в эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной

кишки и оценивалась их взаимосвязь с клинико-эндоскопическими обострениями у детей с ВЗК.

Макроскопическая эндоскопическая семиотика состояния пищеварительного тракта у детей с ВЗК была разнообразной. В 21 из 24 случаев (87,5%) воспалительная активность в желудке и двенадцатиперстной кишке была умеренной или отсутствовала. Однако у 3 больных (12,5%) наблюдались эрозивные и язвенные поражения вышеперечисленных отделов пищеварительного тракта.

При БК язвы были, как правило, характерной щелевидной формы по типу “следов улитки” с налетом фибрина. Однако, для достоверной оценки плотности клеточных разрывов и для исключения артефактов, проводилось конфокальное сканирование макроскопически неизмененной слизистой оболочки.

У всех 13 детей разрывы щеточной каймы в двенадцатиперстной кишке при конфокальной лазерной эндомикроскопии, в отличие от варианта нормы (рис. 15), представляли собой белые зоны между окрашенными темным эпителиальными клетками, что было следствием затеков введенного внутривенно флуоресцеина в межклеточное пространство, также флуоресцеин вытекал из разрывов в просвет кишки (рис. 16).

Гистологический диагноз ВЗК с помощью биопсии и традиционного гистологического исследования был подтвержден у всех 24 больных. Для оценки барьерной функции тонкой кишки у этих больных была использована световая микроскопия с окраской виллином, которая показала разрывы щеточной каймы ворсин как тонкой, так и двенадцатиперстной кишки (рис. 17**)** у всех 24 детей.

Виллин – 95kD гликопротеин микроворсин, связанный с поверхностью гастроинтестинального слизистого эпителия. Анти-виллин маркирует зону щеточной каймы в гастроинтестинальном слизистом эпителии, благодаря чему разрыв щеточной каймы не окрашивался красителем и хорошо виден на препарате (желтые стрелки указывают на место разрыва). Была выявлена

корреляционная взаимосвязь между наличием эпителиальных разрывов щеточной каймы и обострением при ВЗК.

Среди конфокальных видео (n=19) подвздошной кишки с оценкай по критериям разработанным J.J. Liu [65-66], взаимосвязь между эпителиальными разрывами и обострением ВЗК зависела от количества осмотренных зон (p=0,01). Присутствие разрывов эпителия на конфокальных изображениях предсказывали обострение с точностью до 100% в случаях, если было осмотрено ≥3 зон с оценкой по логарифмическому ранговому критерию (p=0,32), статистическому критерию (p=0,60) (рис. 18). При осмотре менее двух зон достоверности информации получено не было (рис. 19). Плотность клеточных разрывов эпителия подвздошной кишки, рассчитанная как количество разрывов на 1000 эпителиальных клеток, у пациентов контрольной группы составила менее 1%, в то время как в группе больных с ВЗК в 6 случаях (25%) была более 1%, что говорили о нарушении барьерной функции подвздошной кишки у этих больных. У всех 6 пациентов с плотностью клеточных разрывов щеточной каймы более 1% в течение менее чем 6 месяцев развивалось клинико-эндоскопическое обострение ВЗК (рис. 18). Плотность клеточных разрывов эпителия щеточной каймы ворсин подвздошной кишки у детей с ВЗКсоставила 5,6±1,7 разрывов на 1000 клеток, в то время как в двенадцатиперстной кишке была 1,7±0,5 разрывов на 1000 клеток. Была выявлена умеренная корреляция между плотностью клеточных разрывов в подвздошной и двенадцатиперстной кишке с коэффициентом корреляции Спирмена 0,42 (p=0,15).

Таким образом, результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что при нарушениях барьерной функции слизистой оболочки тонкой кишки у детей с ВЗК, выявленных с помощью ЗКЛЭМ, обострение наступает с точностью 100% в течение следующих после исследования 6 месяцев. Коэффициент корреляции Спирмена между обнаруженными изменениями в слизистой оболочке двенадцатиперстной и

подвздошной кишке был равен 0,42, что подтверждает умеренную степень корреляции.

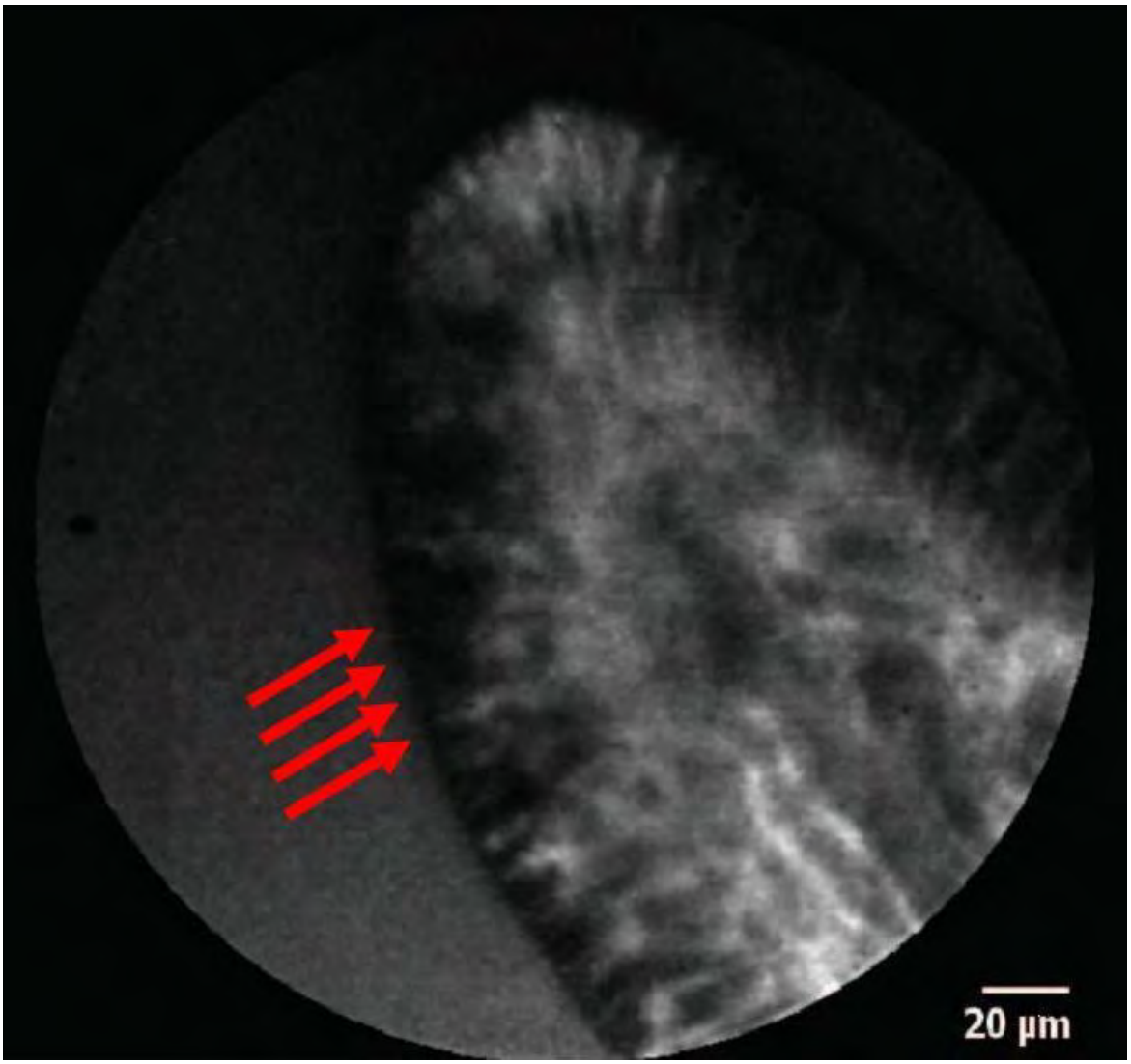


Рис. 15. Ворсина двенадцатиперстной кишки без нарушения барьерной функции (вариант нормы по данным ЗКЛЭМ). Красными стрелками показана целостность щеточной каймы (без отсутствия разрывов или затеков флуоресцеина).

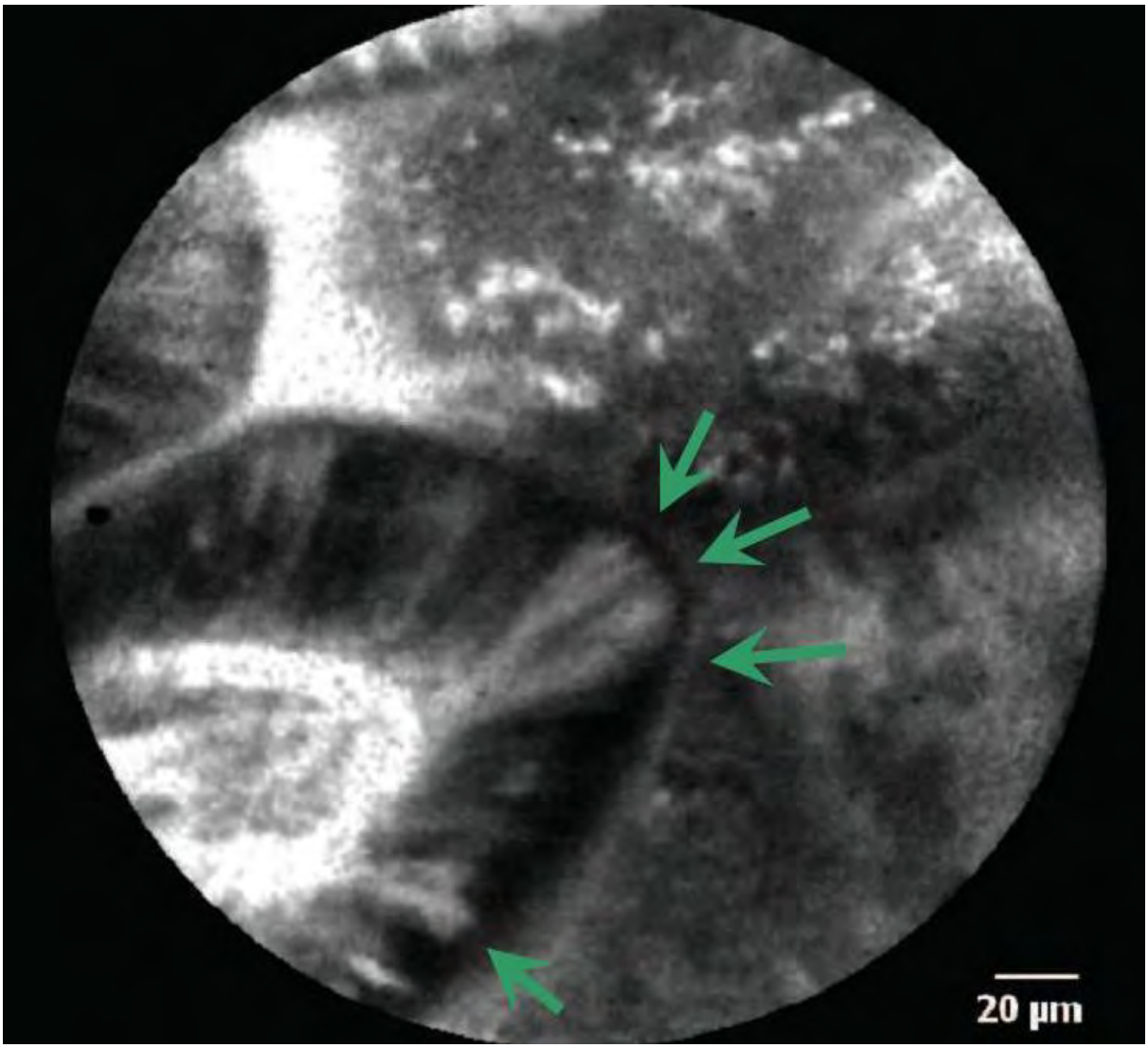


Рис 16. Разрывы щеточной каймы ворсин двенадцатиперстной кишки, обнаруживаемые при конфокальной лазерной эндомикроскопии. Зелеными стрелками указаны места разрывов с затеками флуоресцеина.

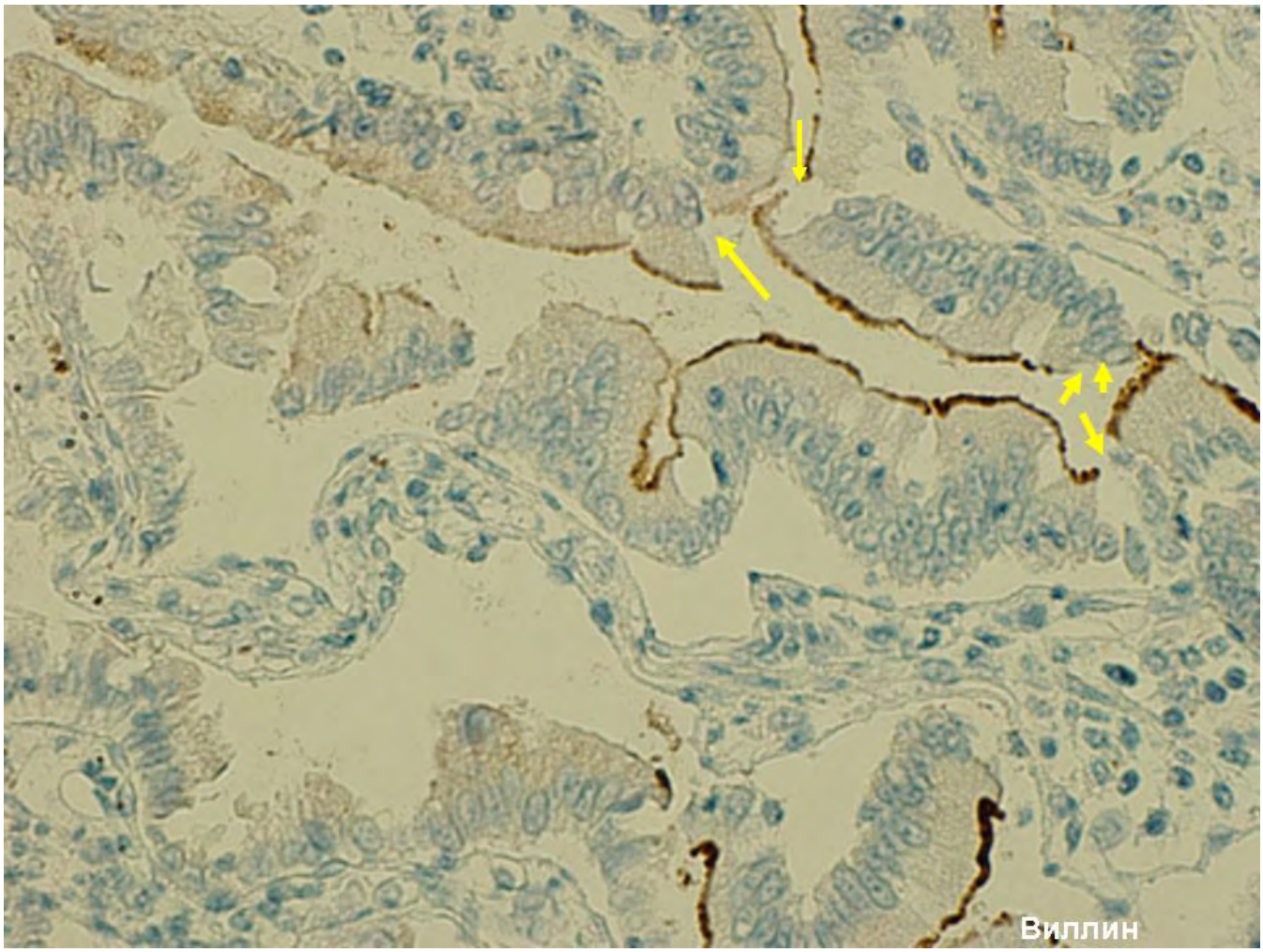


Рис. 17. Гистологическое изображение разрывов щеточной каймы микроворсин при окраске виллином (прерывающаяся коричневая линия); показаны желтыми стрелками.

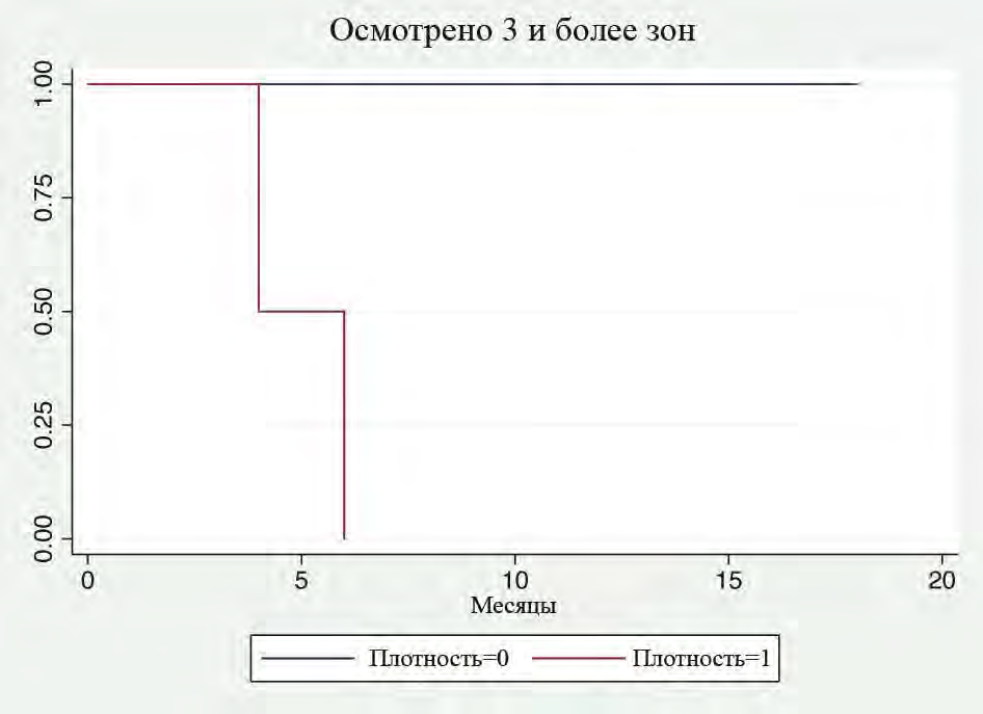


Рис. 18. Кривые выживаемости Каплана-Мейера. При осмотре ≥3 зон по методу J.J. Liu наступление стадии обострения у больных с клеточными разрывами (красная линия) наступало в 100% случаев менее чем через 6 мес. У пациентов, не имеющих разрывов клеток эпителия (синяя линия) обострений ВЗК не наблюдалось.

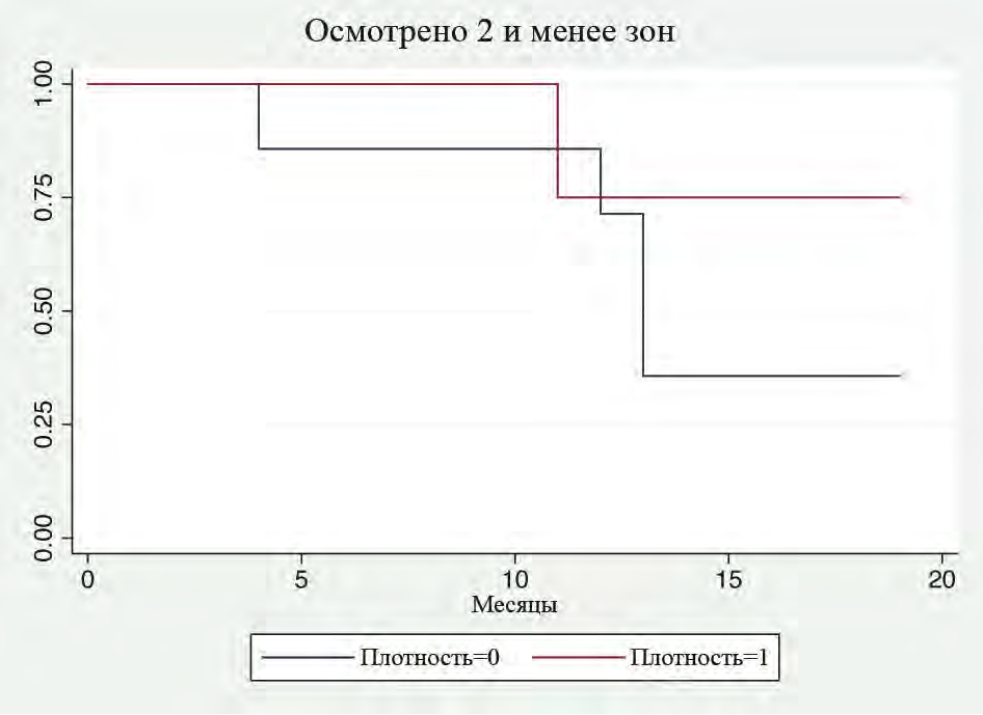


Рис. 19. Кривые выживаемости Каплана-Мейера. При осмотре 2 или менее зон информация была не достоверной.

3.7. Результаты применения внутривенного флуоресцеина при оптической биопсии у детей

В данной серии наблюдений при введении 10% флуоресцеина натрия из расчета 5 мг/кг массы тела серьёзных побочных эффектов выявлено не было.

Среди побочных эффектов, наблюдаемых при проведении исследований с внутривенным введением флюоресцина, наиболее частыми были кратковременное пожелтение кожных покровов и видимых слизистых оболочек и ярко желтое окрашивание мочи, которые самостоятельно купировались в течение 2-3 часов. Незначительная тошнота и позывы на рвоту отмечались у 2 детей (1,7%). Однако данные побочные явления связать с внутривенным введением флюоресцина не представляется возможным, так как эти же проявления могут сопровождать применявшееся при исследовании общее обезболивание.

Таких побочных явлений при проведении исследований, как кратковременная гипотензия, воспаление в месте инъекции, самокупирующаяся сыпь, незначительные эпигастральные боли, описанные у взрослых [18], в данной серии наблюдений при проведении оптической биопсии не отмечались (табл. 13).

В целом, минимальные побочные эффекты на внутривенное введение флуоресцина в дозе 5 мг/кг под общим обезболиванием можно связать с правильным отбором больных для проведения ЗКЛЭМ.

Таблица 13. Нежелательные явления при внутривенном введении флуоресцеина.

	Незначительные побочные эффекты	Количество
1	Кожные высыпания	0 (0%)
2	Тошнота, рвота	2 (1,7%)
3	Боль в животе	0 (0%)
4	Нарушения гемодинамики	0 (0%)
5	Серьезные побочные эффекты	0 (0%)

ГЛАВА 4. КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ В ОЦЕНКЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ У ДЕТЕЙ.

В настоящее время считается, что лапароскопическая фундопликация по Ниссену обеспечивает лучшую защиту от осложнений ГЭРБ. Такие осложнения, как пищевод Барретта, пептический эзофагит, стриктуры органа, полиповидные образования пищеводно-желудочного перехода и другие требуют гистологического подтверждения диагноза. С этой целью использовалась оптическая биопсия *in vivo* не только для дифференциальной, эндомикроскопической диагностики этих осложнений, но и для оценки эффективности их хирургического лечения у 29 больных в возрасте от 3 до 18 лет (средний возраст 11,6 ± 3,6 лет).

Предоперационная подготовка включала комплекс мероприятий, направленных на медикаментозную коррекцию моторно-эвакуаторной и секреторной функции пищевода и желудка.

Общепринятая эндоскопическая полипэктомия образований пищеводно-желудочного перехода свыше 5мм в диаметре выполнялась в зависимости от результатов ЗКЛЭМ и предшествовала лапароскопической фундопликации по Ниссену у 2 детей.

Эндоскопическая семиотика воспалительных изменений слизистой оболочки пищевода до оперативного вмешательства была подтверждена у 29 детей, из которых эзофагит I степени наблюдали у 10 (34,5%) пациентов, II степени - у 7 (24,1%), III степени - у 4 (13,7%), IV степени - у 8 (27,5%). Полиповидные образования пищеводно-желудочного перехода обнаружены у 9 детей (31%), при этом у 5 пациентов пределялась очаговая гиперплазия на вершине утолщенной складки и образования менее 5 мм в диаметре, образования размером более 5 мм в диаметре наблюдали у 4 больных.

До операции при проведении ЗКЛЭМ обнаруживались воспалительные изменения слизистой оболочки у 25 детей (86,2%), желудочная и кишечная метаплазия у 4 пациентов (13,6%). Эндомикроскопическая структура

полиповидных образований была гиперпластической у 7 (24,1%) больных, аденоматозной - у 2 (6,8%) пациентов. У одного ребенка при оптической биопсии обнаруживалась неизмененная слизистая оболочка пищевода.

Гистологическая картина биоптатов слизистой оболочки пищевода до операции диагностировала ее воспалительные изменения у 25 больных (86,2%), желудочную и кишечную метаплазию у 4 пациентов (13,6%), гиперпластическую и аденоматозную структуру полиповидных образований у 7 (24,1%) и 2 (6,8%) детей соответственно. Ни в одном из представленных препаратов не было обнаружено диспластических изменений слизистой оболочки пищевода.

Полное совпадение гистологической и конфокальной картины было обусловлено тяжестью клинических и эндоскопических проявлений ГЭРБ у пациентов, нуждавшихся в хирургической коррекции.

До недавнего времени единственным методом дифференциальной диагностики аденоматозных и гиперпластичеких полипов было проведение прицельной биопсии с последующим гистологическим исследованием и по показаниям, их отсроченным удалением. Возможность верификации эндомикроскопической структуры полиповидных образований пищеводно-желудочного перехода с помошью оптической биопсии во время проведения внутрипросветного исследования наиболее полно соответствовала стратегии одномоментной диагностики и удаления. Конфокальные признаки аденоматозного перерождения, явились абсолютным показанием для одномоментной эндоскопической электроэксцизии полипа, которая предшествовала лапароскопической фундопликации по Ниссену у 2 детей.

Визуализация эндомикроскопических признаков структуры ткани, характерных для гиперпластических изменений, не подвергалась полипэктомии и требовала динамического наблюдения после хирургического лечения у 7 детей.

Эндоскопическое исследование через 6 месяцев после оперативного лечения показало неизмененную слизистую оболочку пищевода у 20 (68,9%)

больных, воспалительные изменения были отмечены у 9 (31,1%) детей. При этом эзофагит I степени диагностировался у 5 детей (17,2%), IV степени - у 4 детей (13,7%), гиперпластические полипы, оставленные до операции *in situ*, после проведения хирургического лечения у 4 больных уменьшились в размерах, претерпевая обратное развитие вплоть до полного исчезновения (катамнез 15 месяцев), а у 3 пациентов остались неизмененными. Рецидивов образования полипов через 6 месяцев после эндоскопической полипэктомии не отмечено (табл. 1).

Конфокальная эндомикроскопия через 6 месяцев после оперативного лечения у 18 детей (62 %) обнаруживала клетки плоского эпителия (похожего на чешую) без ворсин или крипт и светло окрашенные капиллярные кольца, что соответствовало неизмененной слизистой оболочке пищевода (рис. 11). Эзофагит наблюдали у 7 (24,1%) пациентов, желудочную метаплазию - у 2 (6,8%) больных, кишечную метаплазию у 2 (6,8%) детей, гиперпластические полипы в 3 (10,3%) случаях.

При гистологическом исследовании биоптатов неизмененной слизистой оболочки пищевода спустя 6 месяцев после операции обнаруживался многослойный плоский (“сквамозный”) эпителий пищевода со слизистыми железами у 17 (58,6%) больных, эзофагит верифицировался у 8 (27,5%) детей, желудочная метаплазия - у 2 (6,8%), кишечная метаплазия - у 2 (6,8%), гиперпластический полип - у 4 (13,7%) больных.

Такие осложнения ГЭРБ, как желудочная и кишечная метаплазии, не претерпевали обратного изменения, что объясняет полное совпадение результатов гистологического исследования и данных конфокальной эндомикроскопии до и после оперативного лечения (табл. 14).

Полученные данные позволяют утверждать, что уменьшение выраженности воспалительных изменений в слизистой оболочке и увеличение числа наблюдений неизмененной слизистой оболочки пищевода в отдаленные сроки, могут быть объективным показателем адекватного хирургического лечения ГЭРБ, а эндомикроскопическое подтверждение ее

осложнений может быть абсолютным показанием к проведению лапароскопической фундопликации по Ниссену (рис. 20).

Поскольку “золотым стандартом” в оценке структуры слизистой оболочки пищевода признается только гистологическое исследование биоптатов, для определения чувствительности и специфичности ЗКЛЭМ были сопоставлены результаты гистологического и эндомикроскопического методов до и после операции. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,94, что свидетельствует о тесной корреляционной зависимости между ЗКЛЭМ и гистологическим исследованием в данной серии наблюдений (p=0,001).

Таким образом, эндоскопическое исследование, дополненное оптической биопсией слизистой оболочки, позволяет значительно улучшить точность ранней диагностики различных осложнений ГЭРБ и позволяет оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий.

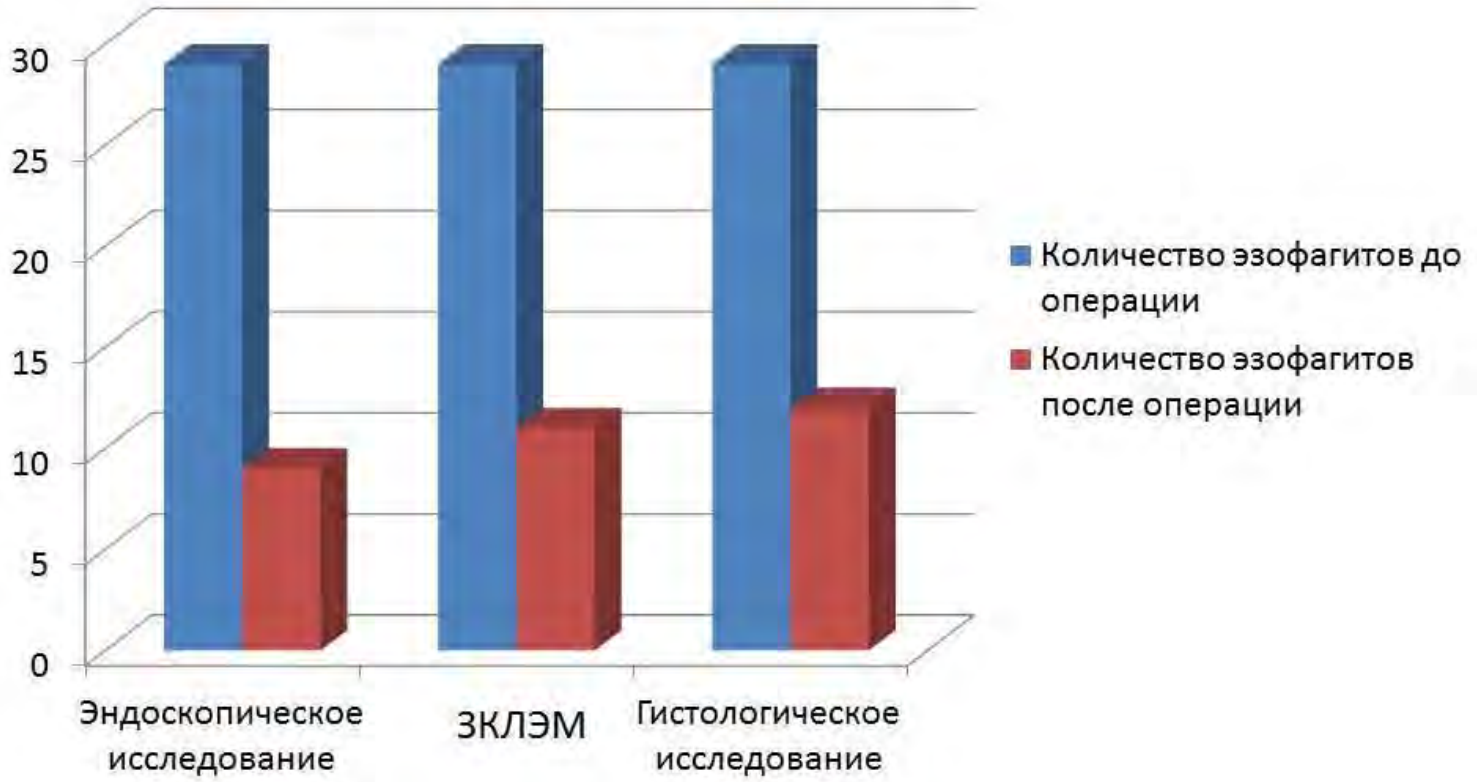


Рис. 20. Эффективность эндоскопического исследования и ЗКЛЭМ по сравнению с гистологическим исследованием в диагностике эзофагитов до и после операции.

Таблица 14. Сравнение частоты выявления изменений слизистой оболочки пищевода до и после фундопликации по данным эндоскопических, конфокальных и гистологических методов исследования.

Разновидность изменений в пищеводе	До операции	После операции
Традиционное эндоскопическое исследование		
Без изменений	0 (0%)	20 (68,9%)
I степень	10 (34,5%)	5 (17,2%)
II степень	7 (24,1%)	0 (0%)
III степень	4 (13,7%)	0 (0%)
IV степень	8 (27,5%)	4 (13,7%)
Конфокальная лазерная эндомикроскопия		
Без изменений	0 (0%)	18 (65,5%)
Эзофагит	25 (86,2%)	7 (20,0%)
Желудочная метаплазия	2 (6,8%)	2 (6,8%)
Кишечная метаплазия	2 (6,8%)	2 (6,8%)
Гиперпластические полипы	7 (24,1%)	3 (10,3%)
Аденоматозные полипы	2 (6,8%)	0 (0%)
Гистологическое исследование		
Без изменений	0 (0%)	17 (58,6%)
Эзофагит	25 (86,2%)	8 (27.5%)
Желудочная метаплазия	2 (6,8%)	2 (6,8%)
Кишечная метаплазия	2 (6,8%)	2 (6,8%)
Гиперпластические полипы	7 (24,1%)	3(10,3%)
Аденоматозные полипы	2 (6,8%)	0 (0%)

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Болезни органов пищеварения у детей являются одной из актуальных проблем современной педиатрии. В их структуре ведущее место занимают воспалительные изменения слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки, выявляющиеся у каждого третьего ребенка, а их этиология весьма разнообразна [1, 50]. Высокий уровень их распространенности, длительное, нередко рецидивирующее течение с развитием тяжелых осложнений, диктует необходимость раннего установления диагноза и назначения адекватной терапии.

Диагноз у детей с болезнями верхнего отдела пищеварительного тракта в большей степени опирается на эндоскопическое исследование с последующей биопсией слизистой оболочки для гистологического исследования. Для таких заболеваний как ГЭРБ, эозинофильный эзофагит, *Helicobacter pylori* ассоциированный гастрит, целиакия, полипы ВОПТ, - ключевую роль в установке диагноза, не смотря на другие методы исследования, играет его гистологическое подтверждение [82].

В последние годы существенно расширились дополнительные опции традиционной внутрипросветной эндоскопии в белом свете. Появление таких технологий как электронная хромоскопия (NBI, FICE и iScan), хромоскопия при помощи контрастных веществ, а также эндоскопов высокого разрешения с возможностью увеличивать изображения в несколько раз, позволяет улучшить диагностику болезней верхнего отдела пищеварительного тракта. Однако данные методы не исключают необходимости взятия биопсийного материала для гистологического подтверждения диагноза, оценки эффективности, объема и продолжительности медикаментозной терапии, хирургической коррекции и длительности диспансерного наблюдения за больными. Тем не менее, гистологическое исследование *in-vivo* до настоящего времени оставалась недоступной врачу эндоскописту до изобретения конфокальной лазерной эндомикроскопии.

Последние технические достижения уменьшили конфокальный лазерный сканирующий микроскоп до размера, способного подводить его к слизистой оболочке через рабочий канал стандартного гибкого эндоскопа, позволяя увеличивать изображение в 1000 раз. Технология, которая позволяет во время традиционного эндоскопического исследования в режиме реального времени получать виртуальное гистологическое изображение слизистой оболочки или ее оптическую биопсию, избегая при этом артефактов связанных со сдавливанием ткани при взятии биопсии эндоскопическим форцептом, получила название зондовая конфокальная эндомикроскопия.

Однако до настоящего времени значимость ЗКЛЭМ в оценке результатов лечения и диагностике болезней верхнего отдела пищеварительного тракта у детей не определена, что обусловливает необходимость проведения этих исследований.

Целью данной работы было определить значение ЗКЛЭМ в дифференциальной диагностике для оценки эффективности лечения болезней ВОПТ у детей. Она была реализована с помощью проведения лазерного эндомикроскопического сканирования слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки.

По результатам клинико-эндоскопических, конфокальных и гистологических методов исследования 29 детям с ГЭРБ было показано оперативное вмешательство. В случаях наличия пептического стеноза 3 детям выполнялось бужирование по струне или баллонная дилатация для восстановления просвета пищевода. Эндоскопическая полипэктомия образований пищеводно-желудочного перехода и желудка свыше 5мм у 2 детей выполнялась в зависимости от результатов ЗКЛЭМ и предшествовала лапароскопической фундопликации по Ниссену у нуждавшихся в оперативном лечении больных.

ЗКЛЭМ у взрослых - это эффективная и безопасная процедура, с низким уровнем незначительных побочных явлений [17]. Однако роль

данного исследования у детей все еще находится в стадии развития. С 2004 года после публикации первого исследования, посвященного конфокальной лазерной эндомикроскопии, количество выполнения данных процедур продолжает увеличиваться [83]. Публикаций о применении и безопасности конфокальной лазерной эндомикроскопии в педиатрической практике крайне невелико, и, в основном, они посвящены эндоскопической КЛЭМ. Работ, посвященных использованию зондовой конфокальной лазерной эндомикроскопии у детей, в доступной литературе найдено не было.

Уровень незначительных побочных явлений при введении флуоресцеина 1,6% в нашей серии наблюдений сравним с таковым у взрослых больных, где приводится цифра 1,4%, а серьезных, несущих угрозу жизни, осложнений при применении ЗКЛЭМ в гастроэнтерологической практике до настоящего времени не отмечалось [17, 24, 82].

Низкий уровень нежелательных явлений в нашей работе также обусловлен строгим выполнением протокола отбора больных для проведения исследования и соответственно малым количеством сопутствующей патологии, системой последовательного мониторинга и ведения больных после ЗКЛЭМ, а также богатым опытом наших врачей анестезиологов и эндоскопистов.

В полученных нами результатах оптической биопсии неизмененная слизистая оболочка пищевода характеризовалась присутствием клеток плоского эпителия (“сквамозного”, похожего на чешую), без ворсин или крипт, и светло окрашенных капиллярных колец. Такие же критерии неизмененной слизистой оболочки пищевода наблюдались и при гистологическом исследовании биоптатов, а также в исследовании посвященном интерпретации конфокальных изображений неизмененной слизистой оболочки у взрослых пациентов [24].

Стойкие симптомы эзофагита, связанные с ГЭРБ, как правило, являются наиболее распространенным показанием для проведения ЭГДС в педиатрии [1,50,82]. Находки на внутрипросветном эндоскопическом исследовании могут варьировать от неизмененной слизистой оболочки или умеренно выраженной очаговой эритемы и рыхлости слизистой абдоминального отдела пищевода до множественных линейных эрозий и язв, а иногда и стриктур пищевода [79]. Однако ЭГДС в качестве единственного метода обследования имеет низкую чувствительность и специфичность к не эрозивным формам рефлюкс-эзофагита [82]. Главным преимуществом данной процедуры является возможность взятия биопсии для последующего гистологического исследования. Последнее является ключевым элементом в постановке диагноза, но в то же время, при наличии микроскопического воспаления взятие биопсии случайным образом может приводить к ложноотрицательным результатам [82]. ЗКЛЭМ в отличии гистологического исследования, ограниченного размерами биоптата, позволяет осматривать слизистую оболочку на более протяженных участках, что может помочь в выявлении патологически измененного очага и, при наличии сомнений, взятии прицельной биопсии. В полученных нами результатах оптической биопсии на эзофагит указывали наличие полиморфноклеточной инфильтрации с нарушением микроциркуляции и ангиоархитектоники сосудистого русла, с нечеткой структурой клеток плоского эпителия. Такие же критерии были обнаружены при гистологическом исследовании фрагментов слизистой оболочки пищевода при эзофагите. Сильная корреляционная зависимость (коэффициент корреляции Спирмена 0,79; p=0,001), а также высокая чувствительность (88,8%), специфичность (88,3%) и точность (88,6%) ЗКЛЭМ в диагностике эзофагитов продемонстрированная в данной работе позволяет в режиме реального времени получать данные о микроскопической воспалительной активности, а также проводить неограниченное количество оптических биопсий, без травмирования слизистой оболочки, что крайне важно в педиатрической практике.

Пищевод Барретта является общеизвестным и грозным осложнением ГЭРБ, и связанных с ним рисков малигнизации. Несмотря на то, что ПБ достаточно редкая патология у детей, в мировой литературе описано более десяти педиатрических случаев рака пищевода, связанного с ПБ [84]. Для гистологического подтверждения диагноза кишечной метаплазии необходимо взятие большого количества биопсий по международному протоколу Seattle или четырех квадратным методом через каждые 2 см измененного сегмента пищевода [85], что приводит к дополнительной травматизации слизистой оболочки, а также увеличению времени и финансовых затрат связанных с гистологическим исследованием. Так же стоит учитывать, что появление бокаловидных клеток в поле зрения при кишечной метаплазии это процесс, связанный с возрастом больного, а их количество увеличивается с 50% в детском возрасте до 85% у взрослых больных с ПБ, что еще раз подтверждает необходимость в большом количестве биопсий [82]. У больных с метапластическими изменениями пищевода можно обнаружить три типа эпителия: перерождение по типу слизистой кардиального отдела желудка, по типу слизистой фундального отдела желудка и по типу кишечной метаплазии с бокаловидными клетками. Несмотря на то, что с хронической ГЭРБ могут встречаться все три типа клеток одновременно, было доказано, что только кишечная метаплазия имеет склонность к дальнейшим диспластическим изменениям [82]. В связи со всем вышеперечисленным определенный интерес представляет метод ЗКЛЭМ, позволяющий в режиме реального времени дифференцировать тип метаплазии, избегая множественных биопсий, и связанных с ними осложнений. По результатам наших исследований при ЗКЛЭМ замена плоского эпителия цилиндрическим с круглыми и дифференцированными желудочными железами свидетельствует о желудочной метаплазии пищевода, а ворсиноподобные структуры с темными бокаловидными клетками – о пищеводе Барретта. Такие же признаки наблюдались при гистологическом исследовании фрагментов слизистой оболочки пищевода

при вышеуказанных патологиях. В данной работе ЗКЛЭМ при диагностике метапластических изменений пищевода показала высокие значения чувствительности (92,3%) специфичности (95,3%), точности (94,2%), а также сильную корреляционную взаимосвязь с гистологическим исследованием (коэффициент корреляции Спирмена 0,85; p=0,001). Эти данные сравнимы с данными из исследований во взрослой популяции больных. В одном проспективном исследовании 63 взрослых пациентов чувствительность и специфичность конфокальной лазерной эндомикроскопии к метапластическим изменениям пищевода составила 98,1% и 94,1% соответственно [12]. В другой работе точность метода при диспластичеких изменениях ПБ составила 81,5% [86], однако в нашей серии наблюдений диспластических изменений не наблюдалось, что может объяснить более высокую точность метода 94,2%. Недавнее проспективное, мультицентровое, рандомизированное исследование сравнивало применение традиционного эндоскопического исследования в белом свете дополненного конфокальной лазерной эндомикроскопией и прицельной биопсией слизистой оболочки с традиционным эндоскопическим исследованием в белом свете дополненное случайными биопсиями. У 192 больных прицельные биопсии с конфокальной лазерной эндомикроскопией продемонстрировали значительно более высокую выявляемость неоплазий (34%) по сравнению со случайными биопсиями (7%), при этом сократилось общее число биопсий. По сравнению с традиционной ЭГДС со случайными биопсиями (40%), чувствительность КЛЭМ с прицельной биопсией к неоплазии составила 96%. Только у одного больного в данном исследовании была пропущена метаплазия методом КЛЭМ, но выявлена случайной биопсией [87]. Эти результаты частично сопоставимы с нашими данными, где методом ЗКЛЭМ ПБ и ЖМ не диагностировались всего у 2 больных, а чувствительность, положительная прогностическая ценность и отрицательная прогностическая ценность составили 92,3%, 86,4% и 90,4% соответственно.

Таким образом, ЗКЛЭМ в ближайшем будущем может стать весомым дополнением в дифференциальной диагностике метаплазий пищевода. Потенциально данная технология в ближайшем будущем может позволить отказаться от необходимости взятия биопсийного материала для гистологического подтверждения диагноза. На данный момент оптическая биопсия в режиме реального времени определяет неизмененную, воспаленную или метаплазированную слизистую оболочку, повышает точность ранней диагностики, позволяет судить о динамике патологических изменений в режиме реального времени, определять тактику лечебных мероприятий дифференцируя больных с желудочной метаплазией и ПБ. Все это позволит принимать правильные решения в тактике ведения больных с данной патологией, а сокращение количества биопсий взятых по четырех квадратному методу [85] и уменьшение времени на их выполнение, сводит риски осложнений к минимуму.

Полипы пищеводно-желудочного перехода и желудка являются нередкой случайной находкой при ЭГДС верхнего отдела пищеварительного тракта, а частота их выявления по последним данным увеличилась [1,50,88]. Большинство полипов у детей являются гиперпластическими [50,82,88] и требуют удаления только при размерах более 5мм, изъязвлении его верхушки, а при гистологическом подтверждении гиперпластического полипа не требуют последующего эндоскопического наблюдения [82]. В то же время, аденоматозные полипы склонны к диспластическим изменениям. Эндоскопическая полипэктомия является эффективной и малоинвазивной процедурой, но, тем не менее, ее возможные осложнения включают перфорацию и кровотечение, встречающиеся менее чем в 1% случаев [82]. Учитывая вышесказанное, актуальной проблемой является дифференциальная диагностика аденоматозных и гиперпластических полипов в режиме реального времени непосредственно во время проведения эндоскопического исследования. В данном случае ЗКЛЭМ может позволить предсказать результаты гистологического исследования, таким образом,

увеличивая эффективность проводимой эндоскопической процедуры. Полученные нами результаты говорят о том, что эндомикроскопическому изображению гиперпластического полипа соответствует узкий, щелевидный или звездчатой формы просвет крипт, ворсиноподобные структуры неправильной формы, темный нерегулярно утолщенный эпителий и темные бокаловидные клетки характерны - для ворсинчатой аденомы. Такие же критерии определения гиперпластических полипов и ворсинчатых аденом наблюдались при гистологическом исследовании полипов ВОПТ. В данной работе ЗКЛЭМ в дифференциальной диагностике полипов ВОПТ показала высокую чувствительность (92,4%) и специфичность (95,2%) с коэффициентом корреляции Спирмена 0,95 (p=0,001), что говорит о сильной корреляционной взаимосвязи с гистологическим исследованием. Полученные результаты сходятся с результатами исследований, опубликованных в мировой литературе, где чувствительность варьирует в диапазоне 91 - 100%, а специфичность - 76 - 99,4% [11, 22, 89, 90]. В будущем данная технология может позволить отказаться от необходимости гистологического исследования при дифференциальной диагностике полипов пищеварительного тракта. На момент написания этой работы Американским Обществом Гастроинтестинальной Эндоскопии (ASGE) были разработаны клинические рекомендации для взрослых больных, на основе которых можно применять метод оптической биопсии и оставлять полип in situ. Были рассмотрены и рекомендовались к применению две стратегии названные “оставлять позади” и “одномоментная диагностика, удаление и утилизация”. Последнее подразумевает диагностику и удаление полипа без гистологического подтверждения его структуры. Однако для реализации данных стратегий рекомендованные параметры точности и негативной прогностической ценности, которыми должен обладать метод ЗКЛЭМ при рутинном использовании должны быть не менее 90% [91]. Все это позволит значительно снизить рабочую нагрузку на гистологические лаборатории, а

так же уменьшить время установления окончательного диагноза, связанного с подготовкой препаратов для гистологического исследования.

В настоящее время в мире не существует общепринятой КЛЭМ классификации поражений желудка, а количество печатных работ о применении данного метода при патологиях желудка невелико [23,92]. Тем не менее, основываясь на результатах собственных наблюдений, оптическая биопсия может применяться у детей для дифференциальной диагностики неизмененной и воспаленной слизистой оболочки желудка. По полученным нами результатам ЗКЛЭМ неизмененной слизистой оболочке желудка при оптической биопсии соответствует наличие регулярно расположенных округлых желез (крипт) в фундальном отделе и в виде “булыжной мостовой” в антральном отделе, а также наличие регулярно расположенных слегка извитых или прямых кровеносных сосудов, окружающих крипты. Однако на конфокальных изображениях при гастрите будет наблюдаться наличие полиморфноклеточной инфильтрации с нарушением микроциркуляции и ангиоархитектоники сосудистого русла, дистрофия желез и удвоение крипт. Такие же дифференциальные критерии неизмененной и воспаленной слизистой оболочки желудка можно наблюдать и при гистологическом исследовании. В данной работе чувствительность ЗКЛЭМ в диагностике гастритов составила 83,7%, специфичность 87,5%, положительная прогностическая значимость 93,9%, отрицательная прогностическая значимость 70,0%, точность 84,9% и коэффициентом корреляции с гистологией 0,67 (p=0,001). Также в мировой литературе опубликованы случаи применения оптической биопсии в дифференциальной диагностике *Helicobacter pylori* инфекции. В одном из исследований, проведенных у взрослых больных, была продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность метода в диагностике *H. pylori*, ассоциированной с ним атрофии крипт и кишечной метаплазии (82,9% и 90,9% для инфекции, 92,9% и 95,2% для атрофии, 98,6% и 100% для кишечной метаплазии соответственно) [23]. Однако, для идентификации *H. Pylori* в данной работе в

качестве контрастного средства местного применения дополнительно использовался 0,2% раствор акрифлавин гидрохлорида. Это контрастное средство запрещено к применению у людей в РФ, США и некоторых других странах мира [17,20]. Препарат запретили после выявления его мутагенных свойств, считается, что акрифлавин связывается с нуклеиновыми кислотами и влияет на ДНК клетки [17,20]. На момент написания работы не прекращается поиск альтернативных контрастных веществ (в частности 2% крезил виолет и тетрациклин), но до настоящего времени все они не получили разрешения на применение у людей. У взрослых больных КЛЭМ в основном используется для диагностики раковых и предраковых изменений желудка. Li с соавторами провел 2 фазное исследование по сравнению традиционной ЭГДС в белом свете и КЛЭМ в диагностике поверхностных патологически измененных областей желудка. В первой фазе исследования на 182 больных были определены критерии интерпретации кишечной метаплазии желудка, неоплазии желудка и рака. Во второй фазе данные критерии были подтверждены на 1572 больных. Авторы выяснили, что специфичность КЛЭМ и ЭГДС была примерно одинакова, однако КЛЭМ имела превосходство в чувствительности и позитивной прогностической ценности (88,9% и 85,3%, 72,2% и 41,6% соответственно) [92]. В заключении хотелось бы отметить, что КЛЭМ в области желудка на данный момент находится в стадии развития, но потенциал данной технологии при различных заболеваниях данного органа как у взрослых так и у детей не вызывает сомнений.

Так же как и при исследованиях в области желудка, опыт применения оптической биопсии при различных патологических состояниях слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки весьма ограничен.

Основываясь на результатах собственных наблюдений при ЗКЛЭМ регулярно расположенные, пальцевидной или листовидной формы ворсины с темными бокаловидными клетками, расположенными между энтероцитами, характерны для неизмененной слизистой оболочки двенадцатиперстной

кишки. Однако при дуодените на изображениях оптической биопсии будет наблюдаться наличие полиморфноклеточной инфильтрации с нарушением микроциркуляции и ангиоархитектоники сосудистого русла, деформация ворсин. Такие же дифференциальные критерии неизмененной и воспаленной слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки наблюдались при гистологическом исследовании. В данной работе чувствительность оптической биопсии в диагностике дуоденитов составила 86,7%, специфичность 81,8%, положительная прогностическая ценность 90,7%, отрицательная прогностическая ценность 75,0%, точность 85,1% с коээфициентом корреляции Спирмена 0,67 (p=0,001). В доступной литературе не было найдено данных о применении оптической биопсии при дуоденитах как у взрослых так и у детей. Однако проводились исследования касательно соотношения эндоскопического диагноза дуоденита с его гистологическим подтверждением. Авторы получили весьма интересные результаты, где практически у половины из 190 обследованных взрослых больных эндоскопический диагноз при осмотре двенадцатиперстной кишки не совпадал с гистологическим, позволив им утверждать, что традиционное эндоскопическое исследование в белом свете в качестве единственного метода обследования, является не надежным для постановки диагноза дуоденита [93]. Чувствительность и специфичность традиционной эндоскопии в диагностике данной патологии составила 76-95% и 61-69% соответственно, положительная прогностическая значимость 39-61%, а отрицательная прогностическая значимость 82-98% (p=0,001), что позволило авторам утверждать о гипердиагностике дуоденита при эндоскопическом исследовании, а окончательный диагноз при данной патологии должен быть гистологическим [93]. Метод оптической биопсии позволит нивелировать данный недостаток традиционного эндоскопического исследования в белом свете, позволяя более точно диагностировать дуодениты непосредственно во время проведения внутрипросветной процедуры. Также стоит отметить, что оба случая диагностики целиакии при оптической биопсии совпали с

результатами гистологического заключения. Эти данные можно соотнести с результатами наиболее крупного на данный момент исследования применения оптической биопсии при целиакии у 31 взрослого больного (6 первичных целиакий, 11 целиакий после терапии и 14 человек в качестве группы контроля). Авторы отметили хорошую взаимосвязь оптической биопсии с гистологической шкалой атрофии по Marsh, чувствительность составила 94%, специфичность 92% [94]. Два более мелких исследования так же показали хорошую взаимосвязь КЛЭМ с типичными признаками целиакии в виде атрофии ворсин и гипертрофии крипт [95-96].

Влияние нарушения барьерной функции тонкой кишки на курс течения ВЗК у детей на момент написания данной работы не было изучено. Ведутся активные исследования по выявлению факторов способствующих обострению ВЗК. В числе прочих, рассматривается и теория о том, что нарушение барьерной функции кишечника ведет к рецидиву заболевания [25, 57, 58]. До появления метода оптической биопсии, точное гистологическое подтверждение эпителиальных разрывов ограничивалось размерами биоптата и артефактами при фиксации образцов. В исследовании 2012 г. у взрослых больных с ВЗК, по сравнению с группой контроля, авторы обнаружили множественные нарушения целостности структуры щеточной каймы ворсин подвздошной кишки. Была составлена шкала, которая характеризовала тяжесть этих повреждений, варьирующуюся от точечных затеков флюоресцеина до микроэрозий. Чувствительность, специфичность и точность данной шкалы в способности предсказывать обострение ВЗК у взрослых составила 62,5%, 91,2% и 79% соответственно [25].

Однако в более поздних исследованиях J.J. Liu с соавторами пришли к выводам, что качественного описания присутствия и отсутствия разрывов щеточной каймы не достаточно для того, чтобы отличать здоровых людей от больных [65]. В одном из своих исследований они предложили количественную оценку распространенности эпителиальных разрывов

щеточной каймы ворсин тонкого кишечника, и разработали числовую меру: плотность разрывов [66]. Плотность клеточных разрывов расценивали как общее число клеточных разрывов на 1000 клеток подсчитанных в видимой ворсине. При помощи данной системы измерений авторы в своей работе продемонстрировали, что плотность клеточных разрывов у больных с ВЗК значительно больше (61 разрыв/1000 клеток), чем в группе контроля (18разрывов/1000 клеток; $p<0,001$).

В полученных результатах собственных наблюдений у детей больных ВЗК с повышенной плотностью клеточных разрывов умеренное или тяжелое обострение наступает в 100% случаев в период до 6 месяцев с момента проведения исследования, в случае если было осмотрено ≥3 зон по критериям J.J. Liu [65-66] (логарифмический ранговый критерий $p=0,32$, статистический $p=0,60$). В то же время, у больных с нормальной плотностью клеточных разрывов обострение не наступило в период наблюдения до 13 месяцев, а несоблюдение критериев J.J Liu [65-66] делает диагностику не точной. Эти данные сравнимы с результатами исследований проведенных у взрослых больных с ВЗК, где неизмененная барьерная функция, выявленная при КЛЭМ, характеризовалась наступлением обострения в 20%, в то время как у пациентов с нарушенной барьерной функцией обострение наступало в 80% случаев за период наблюдения в 1 год [25, 97]. Так же мы предположили, что при ВЗК нарушение барьерной функции может наблюдаться на всем протяжении тонкого кишечника. В связи с этим была произведена оценка и сравнение плотности клеточных разрывов в двенадцатиперстной и подвздошной кишке у детей с ВЗК. Плотность клеточных разрывов эпителия щеточной каймы ворсин в подвздошной кишке у детей с ВЗК составила 5,6±1,7 разрывов на 1000 клеток, в то время как в двенадцатиперстной кишке была 1,7±0,5 разрывов на 1000 клеток. Была выявлена умеренная корреляционная взаимосвязь между плотностью клеточных разрывов в подвздошной и двенадцатиперстной кишке с коэффициентом корреляции Спирмена 0,42 ($p=0,15$). Это ставит под

сомнение предположение о том, что при ВЗК страдает барьерная функция всего тонкого кишечника, но и не может полностью его опровергнуть из-за малого количества больных вовлеченных в данное исследование. Также можно предположить, что при ВЗК нарушение барьерной функции носит очаговый, а не тотальный характер. Поскольку подобное сравнение было произведено впервые в мире, мы не можем соотнести наши результаты с данными мировой литературы, а сделанное нами предположение нуждается в подтверждении в больших мультицентровых исследованиях с более крупной выборкой больных.

Результаты собственных наблюдений говорят о том, что дополнительная оценка состояния барьерной функции при помощи ЗКЛЭМ у детей с ВЗК позволяет идентифицировать больных с высоким риском возникновения обострения. Точная оценка состояния барьерной функции тонкого кишечника в будущем может позволить выработать алгоритмы для разработки схемы, которая позволит более точно прогнозировать обострения, разделяя больных с ВЗК по группам риска возникновения обострений. Такая схема разделения рисков может быть использована для более персонифицированного подхода при ведении детей с ВЗК, улучшая раннюю диагностику и результаты лечения.

В настоящее время считается, что лапароскопическая фундопликация по Ниссену обеспечивает лучшую защиту от осложнений ГЭРБ. Среди них пищевод Барретта, пептический эзофагит, стриктуры органа, полиповидные образования пищеводно-желудочного перехода и другие требуют гистологического подтверждения диагноза болезни. Следуя этому, в данной работе использовалась оптическая биопсия *in vivo* не только для дифференциальной, эндомикроскопической диагностики этих осложнений, но и для оценки эффективности их хирургического лечения у 29 больных в возрасте от 3 до 18 лет (средний возраст 11,6 ± 3,6лет). Полученные данные позволили утверждать, что уменьшение воспалительных изменений и увеличение числа наблюдений неизмененной слизистой оболочки пищевода

в отдаленные сроки, могут быть объективным показателем адекватного хирургического лечения ГЭРБ, а эндомикроскопическое подтверждение ее осложнений может быть абсолютным показанием к проведению лапароскопической фундопликации по Ниссену.

Поскольку только гистологическое исследование биоптатов признается “золотым стандартом” в оценке структуры слизистой оболочки пищевода для определения корреляционной взаимосвязи были сопоставлены результаты гистологического и эндомикроскопического методов до и после операции. Коэффициент корреляции Спирмена составил 0,94, что говорит о тесной корреляционной зависимости между ЗКЛЭМ и гистологическим исследованием в полученных нами результатах (p=0,001).

Эндоскопическое исследование, дополненное оптической биопсией слизистой оболочки, позволяет значительно улучшить точность ранней диагностики различных осложнений ГЭРБ и позволяет оценить эффективность проводимых лечебных мероприятий.

Лапароскопическая фундопликация по Ниссену дает благоприятный результат в восстановлении замыкательной функции пищеводно-желудочного перехода, и предупреждает воздействие на слизистую оболочку кислотно-пептического фактора, вследствие чего уменьшаются и исчезают воспалительные и эрозивные изменения. Однако не всегда сопровождается полным исчезновением таких патологических изменений слизистой оболочки как желудочная и кишечная метаплазия. Эти изменения чаще встречались у детей с продолжительным течением болезни, поэтому эндомикроскопическое динамическое наблюдение за ними и их хирургическую коррекцию необходимо проводить на более ранних сроках заболевания.

Направления будущих исследований

Конфокальная лазерная эндомикроскопия бурно развивающаяся технология, а область ее применения постоянно расширяется, и появляются новые системы для *in vivo* визуализации тканей на микроскопическом уровне. Одна такая система недавно стала коммерчески доступна и одобрена к применению в США. Она основана на оптическом частотном изображении области, также называется объемная (волюметрическая) конфокальная эндомикроскопия (Ninepoint Medical, Кембридж, США). Система включает в себя баллон с фиброоптическими волокнами, проводимый через рабочий канал эндоскопа и сканирующий по окружности 6 см сегмент просвета (как правило, пищевода). Сканирование высокого разрешения может быть выполнено за 90 секунд с глубиной до 3мм (до мышечного слоя) с разрешением в 7 μm [98]. Основное применение этой системы на данный момент направлено на диагностику пищевода Барретта, с возможностью оценки, как слизистой, так и подслизистой дисплазии и одновременном нанесении лазерных меток для границ последующей эндоскопической резекции.

Двухосевая КЛЭМ еще одна инновационная система, которая пока коммерчески не доступна. При использовании двух осей, можно превзойти многие физические и оптические ограничения одноосевых систем, тем самым увеличивая поле зрения и глубину сканирования по сравнению с обычной КЛЭМ [99].

Оптическая биопсия может быть использована как вспомогательный метод для прицельного взятие фрагментов слизистой оболочки желудка при такой крайне редкой патологии, как коллагенозный гастрит. При данной патологии требуется взятие множественных биопсий желудка во избежание ложноотрицательного диагноза из-за неоднородного распределения коллагена [82].

Комбинирование КЛЭМ с новыми молекулярными маркерами, которые накапливаясь в клетках-мишенях (например, в неопластических), будут вызывать эффект аутофлюоресценции, может значительно повысить чувствительность метода, и исключить ошибки при интерпретации оптической биопсии.

Также помочь в интерпретации изображений может разработка компьютерных алгоритмов или умных атласов, которые посредством обработки значительного количества данных, позволят компьютеру автоматически классифицировать полученные изображения. Данное программное обеспечение может быть использовано в качестве вспомогательного элемента для врача эндоскописта [100].

ВЫВОДЫ

1. Эндомикроскопические критерии неизмененной слизистой оболочки пищевода характеризуются присутствием клеток плоского эпителия (“сквамозного”, похожего на чешую), без ворсин или крипт, и светло окрашенных капиллярных колец. Данная семиотика в 13,9 % случаев не соответствуют эндоскопическому варианту нормы при проведении диагностической эзофагоскопии у детей.
2. Неизмененной слизистой оболочки желудка соответствует наличие регулярно расположенных округлых желез (крипт) в фундальном отделе и в виде “булыжной мостовой” в антральном отделе, а также наличие регулярно расположенных слегка извитых или прямых кровеносных сосудов, окружающих крипты. Данные оптической биопсии в 19,8% не соответствуют эндомакроскопической картине нормы при гастроскопии у детей. Регулярно расположенные, пальцевидной или листовидной формы ворсины с темными бокаловидными клетками, расположенными между энтероцитами, характерны для неизмененной слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Данные оптической биопсии не соответствуют эндомакросокпической картине нормы (18,8%).
3. На воспалительные изменения слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта при оптической биопсии указывает наличие полиморфноклеточной инфильтрации с нарушением микроциркуляции и ангиоархитектоники сосудистого русла, с нечеткой структурой клеток плоского эпителия при эзофагите, дистрофией желез и удвоением крипт при гастрите, деформацией ворсин при дуодените; замена плоского эпителия цилиндрическим с круглыми и дифференцированными желудочными железами свидетельствует о желудочной метаплазии пищевода, а ворсиноподобные структуры с темными бокаловидными клетками –

о пищеводе Барретта; эндомикроскопическому изображению гиперпластического полипа соответствует узкий, щелевидный или звездчатой формы просвет крипт, ворсиноподобные структуры неправильной формы, темный нерегулярно утолщенный эпителий и темные бокаловидные клетки характерны - для ворсинчатой аденомы.

4. Оптическая биопсия наиболее эффективно выявляет метапластические изменения слизистой оболочки пищевода и структуру полиповидных образований верхнего отдела пищеварительного тракта.
5. Сравнительная оценка оптической биопсии и гистологического исследования биоптатов показала, что первая менее эффективна при выявлении воспалительных изменений пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. Для выявления воспалительных изменений слизистой оболочки пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки наиболее информативным является гистологическое исследование биоптатов.
6. Оптическая биопсия существенно повышает эффективность традиционного внутрипростветного исследования в диагностике структуры новообразований, метапластических и воспалительных изменений слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта у детей.
7. Оптическая биопсия характеризуется возможностью неограниченного количества неинвазивных микроскопических исследований, позволяет оценить гистологическую структуру слизистой оболочки на протяженных участках при эндоскопии пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки у детей.
8. Абсолютным показанием эндоскопической малоинвазивной хирургии являются конфокальные эндомикроскопические признаки аденоматозной структуры полипов слизистой оболочки, что

наиболее соответствует лечебной тактике одномоментной диагностики и удаления.

9. Способность оптической биопсии дифференцировать неизмененную и метаплазированную слизистую оболочку помогает в постановке гистологического диагноза, повышает точность ранней диагностики, позволяет определять тактику лечебных мероприятий их эффективность при осложненной гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у детей.
10. Конфокальные признаки нарушения целостности структуры щеточной каймы ворсин тонкого кишечника в виде затеков флуоресцеина с повышенной плотностью клеточных разрывов, свидетельствующие о нарушении барьерной функции, предсказывают обострение умеренной или тяжелой степени тяжести, наступающее за период последующих 6 месяцев с момента обследования при четком соблюдении протокола выполнения исследования.
11. Плотность клеточных разрывов эпителия слизистой оболочки подвздошной и двенадцатиперстной кишки не позволяет сделать заключение о тотальном микроскопическом поражении тонкой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения диагностики болезней верхнего отдела пищеварительного тракта рекомендуется использовать зондовую конфокальную лазерную эндомикроскопию.
2. Критерии неизмененной слизистой оболочки пищевода характеризуются присутствием клеток плоского эпителия и светло окрашенных капиллярных колец. На воспалительные изменения слизистой оболочки при оптической биопсии верхнего отдела пищеварительного тракта указывает наличие полиморфноклеточной инфильтрации с нарушением микроциркуляции и ангиоархитектоники сосудистого русла, с нечеткой структурой клеток плоского эпителия при эзофагите, дистрофией желез и удвоением крипт при гастрите, деформацией ворсин при дуодените; замена плоского эпителия цилиндрическим с круглыми и дифференцированными желудочными железами свидетельствует о желудочной метаплазии пищевода, а ворсиноподобные структуры с темными бокаловидными клетками о пищеводе Барретта; эндомикроскопическому изображению гиперпластического полипа соответствует узкий, щелевидный или звездчатой формы просвет крипт, тогда как ворсиноподобные структуры неправильной формы, темный нерегулярно утолщенный эпителий и темные бокаловидные клетки характерны для ворсинчатой аденомы. Нарушение барьерной функции тонкого кишечника представляет собой белые зоны между окрашенными темным эпителиальными клетками.
3. Детей с воспалительных заболеваний кишечника**,** сопровождающимся нарушением барьерной функции тонкой кишки**,** рекомендуется относить к группе высокого риска возникновения потенциального обострения.

4. Осложнения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни подтвержденные оптической биопсией при эндоскопическом исследовании пищевода являются абсолютным показанием к проведению лапароскопической фундопликации по Ниссену.
5. Сокращение воспалительных изменений и появление неизмененной слизистой оболочки при оптической биопсии могут быть объективным показателем адекватного хирургического лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.А., Климанская Е.В., Римарчук Г.В., ред. Детская гастроэнтерология (избранные главы) – М.: 2002, 592 с.
2. Харитонова А.Ю. Цифровая видеоэндоскопия в диагностике болезней желудка и двенадцатиперстной кишки у детей. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М. 2012. 24 с.
3. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscopy. Scanning. 1988; 10: 128-138.
4. Minsky M. Microscopy apparatus. US Pat. 1961; 467.
5. Egger M.D., Petran M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. Science 1967; 157: 305-307.
6. Brakenhoff G.J., Blom P., Barends P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. J Microscopy. 1979; 117: 219-232.
7. Hamilton D.K., Wilson T. Scanning optical microscopy by objective lens. Scanning J. of Physics. 1986; 19: 52-54.
8. Cavanagh HD**,** Jester JV, Essepian J*, et al*. Confocal microscopy of the living eye. CLAO J.1990;16:65–73.
9. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowits D. et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. J. Invest. Dermatol. 1995; 104: 946-952.
10. Innoe H., Igari T., Nishikage T., et al. A novel method of virtual histopathology using laser-scanning confocal microscopy in-vitro with untreated fresh speciments from the gastrointestinal mucosa. Endoscopy. 2000; 32:439-443.
11. Kiesslich R., Wallace M., Burg J. et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 2004;3:706–713.

12. Kiesslich R., Gossner L., Goetz M., et al. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. Clin. Gastroent. Hepatol. 2006; 4:979-987.
13. Аверьянов А.В., Данилевская О.В., Сазонов Д.В. и др. Конфокальная лазерная эндомикроскопия дыхательных путей – проблемы и перспективы. Клиническая практика. – М. – 2011. - №4. – С.4-12.
14. Kwan A.S., Barry C., McAllister I.L. et al. Flourescein angiography and adverse drug reactions revisited: the Lions Eye experience. Clin experiment ophthalmol. 2006; 34:33-38.
15. Lopez-Saez M.P., Ordoqui E., Tornero P., et al. Fluorescein-induced allergic reaction. Ann Allergy Asthma. Immunol. 1998; 81:428-430.
16. Yannuzzi L.A., Rohrer K.T., Tindel L.J., et al. Fluorescein angiography complication survey. Ophthalmology 1986; 93: 611–617.
17. Wallace M.B.**,** Meining A., Canto M.I., et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2010; 31(5):548-552.
18. Becker V., von Delius S., Bajbouj M., Karagianni A., Schmid R.M., Meining A. 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; 68: 319-323.
19. Wallace M., Bucher A., Becker V., Meining A. Determination of the optimal fluorescein dose of probe-based confocal endomicroscopy in colonic imaging. Gastrointest. Endosc. 2009; 69(5):AB375.
20. De Palma G.D. et al. Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract. World J. Gastoenterol. 2009; 15(46): 5770-5775.

21. George M., Meining A. Cresyl violet as a flourophore in confocal laser scanning microscopy for future in-vivo histopathology. Endoscopy. 2003; 35: 1033-1038.
22. Sanduleanu S., Driessen A., Gomez-Garsia E., Hemeeteman W. et al. In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. Clin. Gastroent. Hepatol. 2010; 8(4):371-378.
23. Wang P., Ji R., Yu T. Classification of histological severity of Helicobacter pylori-associated gastritis by confocal laser endomicroscopy. World J. Gastoenterol. 2010; 16(41): 5203-5210.
24. Wallace M., Lauwers G.Y., Chen Y., et al. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. Endoscopy. 2011; 43(10):882-891.
25. Kiesslich R., Duckworth C.A., Watson A., et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. Gut. 2012; 61(8): 1146-1153.
26. Buchner A.M., Gomez V., Heckman M.G., et al. The learning curve of in vivo probe-based confocal laser endomicroscopy for prediction of colorectal neoplasia. Gastrointest. Endosc. 2011; 73(3):556-560.
27. Wang J., Jiang J., Zhao Y., et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. Cancer Epidemiology. 2011; 35(1): 66-72.
28. De Palma G.D., Staibano S., Siciliano S., et al. In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy. Digestive and Liver Disease. 2010; 42(11): 791-797.
29. Wallace M. B., Ussui V.M. Confocal endomicroscopy of colorectal polyps. Gastroenterology Research and Practice. 2012; Article ID 545679, 6 pages

30. Benneth J.J., Green R.H. Malignant masquerade: dilemmas in diagnosing biliary obstruction. Surgical Oncology Clinics of North America. 2009; 18(2):207-214.
31. Fockens P., Wallace M.B. Probe-based confocal laser endomicroscopy. Gastroenterology. 2009; 136(5): 1509-1513.
32. Loeser C.S., Robert M.E., Mennone A., et al. Confocal endomicroscopic examination of malignant biliary strictures and histologic correlation with lymphatics. Journal of Clinical Gastroenterology. 2011; 45(3):246-252.
33. Meining A., Saur D., Bajbouj M., et al. In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: an examiner blinded analysis. Clin. Gastroent. Hepatol. 2007; 5:1261-1267.
34. Giovannini M., Bories E., Monges G., Pesenti C., et al. Results of a phase I-II study on intraductal confocal microscopy (IDCM) in patients with common bile duct (CBD) stenosis. Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques. 2011; 25(7):2247-2253.
35. Di Pietro M., Fitzgerald R.C. Screening and risk stratification for Barrett's esophagus: how to limit the clinical impact of the increasing incidence of esophageal adenocarcinoma. Gastroenterol. Clin. North Am. 2013; 42(1): 155-173.
36. Pohl H., Rosch T., Vieth M. et al. Miniprobe confocal laser microscopy for the detection of invisible neoplasia in patients with Barrett's esophagus. Gut. 2008; 57: 1648-1653.
37. Ивашкин В.Т., Баранская Е.К, Кайбышева В.О., Иванова Е.В., Федоров Е.Д. Эозинофильный эзофагит: обзор литературы и описание собственного наблюдения. РЖГГК. – 2012. - №1. – С. 71-81.

38. Veerappan G.R., Perry J.L., Duncan T.J. et al. Prevalence of eosinophilic esophagitis in an adult population undergoing upper endoscopy: a prospective study. Clin Gastroenterol Hepatol 2009;7:420-426.
39. Chehade M., Sampson H.A. Epidemiology and etiology of eosinophilc esophagitis. Gastrointest Endosc Clin N Am 2008;18:33-44.
40. Kapel R.C., Miller J.K., Torres C. et al. Eosinophilic esophagitis: a prevalent disease in the United States that affects all age groups. Gastroenterology 2008;134:1316-1321.
41. Atkins D., Kramer R., Capocelli K. et al. Eosinophilic esophagitis: the newest esophageal inflammatory disease. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2009;6: 267-278.
42. Putnam P.E., Rothenberg M.E. Eosinophilic esophagitis: concepts, controversies, and evidence. Curr. Gastroenterol. Rep. 2009; 11: 220-225.
43. Furuta G.T., Liacouras C.A., Collins M.H. et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment.Gastroenterology 2007; 133: 1342-1363.
44. Gonsalves N., Policarpio-Nicolas M., Zhang Q. et al. Histopathologic variability and endoscopic correlates in adults with eosinophilic esophagitis. Gastrointest. Endosc. 2006; 64:313-319.
45. Teitelbaum J.E., Fox V.L., Twarog F.J. et al. Eosinophilic esophagitis in children: immunopathological analysis and response to fluticasone propionate. Gastroenterology 2002; 12: 1216-1225.
46. Neumann H. et al. Description of eosinophilic esophagitis using confocal laser endomicroscopy. Endoscopy. 2011; 43: E66.
47. Kang D., Suter M.J., Boudoux C. et al. Comprehensive imaging of gastroesophageal biopsy samples by spectrally encoded confocal microscopy. Gastrointest Endosc 2010;71: 35-43.

48. Yoo H. et al. Reflectance confocal microscopy for the diagnosis of eosinophilic esophagitis: a pilot study conducted on biopsy specimens. Gastrointest. Endosc. 2011; 74: 992-1000.
49. Nakao M., Yoshida S., Tanaka S. et al. Optical biopsy of early gastroesophageal cancer by catheter-based reflectance-type laser-scanning confocal microscopy. J. Biomed. Opt. 2008; 13: 0540-43.
50. Лазебник Л.Б., Щербаков П.Л. Гастроэнтерология. М.: Издание медицинских книг, 2011. – 357с.
51. Dixon M.F., Genta R.M., Yardley J.H., Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. Am. J. Surg. Pathol. 1996; 20:1161-1181.
52. Harris L., Park J., Voltaggio L. et al. Celiac disease: clinical, endoscopic and histopathologic review. Gastrointest. Endosc. 2012; 76(3): 625-640.
53. Leong R., Humphris J., Swartz D., Egan B. Status of confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal disease. Tropical Gastroenterology. 2012; 33(1): 9-20.
54. Cheon J.H., Kim W.H. Recent advances of endoscopy in inflammatory bowel diseases. Gastrointest. Endosc. 2008; 18:451-466.
55. Венедиктова М.М., Шавров А.А. Конфокальная лазерная эндомикроскопия в диагностике воспалительных заболеваний кишечника у детей. Вопросы диагностики в педиатрии – 2012 - №4. – С. 17-21
56. Loftus E.V. Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. Gastroetnerol. Clin. N. am. 2006; 35: 517-531.
57. Meddings J. The significance of the gut barrier disfynction in disease. Gut. 2008; 57(4):438-440.
58. Watson A.J., Chu S., Sieck L., et al. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layer. Gastroenterology 2005; 129: 902-912.

59. Shih D.Q., Targan S.R. Insights into IBD pathogenesis. Curr. Gastroenterol. Rep. 2009; 11:473-480.
60. Rutgeerts P., Feagan B.G., Lichtenstein G.R., et al. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's Disease. Gastroenterology 2004; 126:402-413.
61. Kiesslich R., Goetz M., Angues E.M. et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal laser endomicroscopy. Gastroenterology 2007; 133:1769-78.
62. Nenci A., Becker C., Wullaert A., et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. Nature 2007; 446:557-61.
63. Garret W.S., Lord G.M., Punit S., et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. Cell 2007; 131:33-45.
64. Kiesslich R., Goetz M., Angues E.M. et al. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal laser endomicroscopy. Gastroenterology 2007; 133:1769-78.
65. Liu JJ., Wong K., Thiesen A.L., et al. Increased epithelial gaps in the small intestines of patients with inflammatory bowel disease: density matters. Gastrointest. Endosc. 2011; 73:1174-80.
66. Liu J.J., Madsen K.L., Boulanger P., et al. Mind the gaps: confocal endomicroscopy showed increased density of small bowel epithelial gaps in inflammatory bowel disease. J. Clin. Gastroenterol. 2011;45:240-5.
67. Kelly C.P., LaMont J.T. Clostridium dificile – more difficult than ever. N. Engl. J. Med. 2008; 359(18): 1932-1940.
68. Abrahamian F.M., Talan D.A., Moran G.J., Pinner R. Update on emerging infections from the Centers for Disease Control and Prevention. Severe Clostridium difficile-associated disease in populations previously at low risk – four states. Ann. Emerg. Med. 2006; 48(1): 55-59.

69. Crobach M.J., Dekkers O.M., Wilcox M.H., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease: data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile infection. Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15(12):1053-1066.
70. Neumann H., Vieth M., Grauer M. et al. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of Clostridium difficile associated colitis - a pilot study. Gastrointest. Endosc. 2011; 73(4): AB142
71. Kiesslich R., Hoffman A., Goetz M. et al. In vivo diagnosis of collagenous colitis by confocal endomicroscopy. Gut. 2006; 55(4):591-592.
72. Zambelli A., Villanacci V., Buscarini E. et al. Collagenous colitis: a case series with confocal laser microscopy and histology correlation. Endoscopy. 2008; 40(7): 606-608.
73. Meining A., Schwendy S., Becker V. et al. In vivo histopathology of lymphocytic colitis. Gastrointest. Endosc. 2007; 66(2): 398-400.
74. Glucksberg H., Storb R., Fefer A. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation. 1974; 18:295-304.
75. Geeg H.J. How to treat acute GVHD. Blood. 2007; 109:4119-4126.
76. Cox G.J., Matsui S.M., Lo R.S., Hinds M., Bowden R.A., Hackman R.C. et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. Gastroenterology. 1994; 107:1398-1407.
77. Shulman H.M., Kleiner D., Lee S.J., Morton T., Pavletic S.Z. et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II Pathology Working Group Report. Biol. Blood Marrow Transplant. 2006; 12:31-47.
78. Bojarski C., Gunther U., Rieger K., Heller F. et al. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. Endoscopy. 2009; 41:433-438.

79. Приворотский В.Ф., Луппова Н.Е. ГЭРБ у детей (проект стандартов диагностики и лечения). Материалы XIV Конгресса детских гастроэнтерологов России. Актуальные проблемы абдоминальной патологии у детей. – М. – 2007. – с.75-90.
80. Jennings B.J., Mathews D.E. Adverse reactions during retinal fluorescein angiography. J Am Optom Assoc 1994; 65:465–71.
81. Moosbrugger K.A., Sheidow T.G. Evaluation of the side effects and image quality during fluorescein angiography comparing 2 mL and 5 mL sodium fluorescein. Can J Ophthalmol 2008; 43: 571–5.
82. Gershman G., Thomson M. Practical Pediatric Gastrointestinal endoscopy, Second edition. 2012. p. 256.
83. Chauhan S.S., Abu Dayyeh B.K., Bhat Y.M., Gottlieb K.T., Hwang J.H., Komanduri S. et al. Confocal laser endomicroscopy. Gastrointest. Endosc. 2014 ;80(6) :928-938.
84. Hassall E., Dimmick J.E., Magee J.F. Adenocarcinoma in childhood Barrett's esophagus. Case documentation and need for surveillance in children. Am. J. Gasteroenterol. 1993;88:282-288.
85. Segal F., H. Breyer. Diagnosis and management of Barrett's metaplasia: What's new? World J. Gastrointest. Endosc. 2012;4(9):379-386.
86. Gaddam S, Mathur SC, Singh M, et al. Novel probe-based confocal laser endomicroscopy criteria and interobserver agreement for the detection of dysplasia in Barrett's esophagus. Am J Gastroenterol 2011;106:1961-9.
87. Canto MI, Anandasabapathy S, Brugge W, et al. In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus-related neoplasia: a multicenter international randomized controlled trial (with video). Gastrointest Endosc 2014;79:211-21.
88. Эрдес С.И., Сергеева Т.Н., Мухаметова Е.М. Суточная pH-метрия у детей и подростков с полипами кардиоэзофагеального перехода. Педиатрия. – 2008. – № 6. – с. 42– 46.

89. Meining A, Saur D, Bajbouj M, et al. In vivo histopathology for detection of gastrointestinal neoplasia with a portable, confocal miniprobe: an examiner blinded analysis. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5: 1261-7.
90. Shahid MW, Buchner AM, Heckman MG, et al. Diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy and narrow band imaging for small colorectal polyps: a feasibility study. Am J Gastroenterol 2012;107:231-9.
91. Rex DK, Kahi C, O'Brien M, et al. The American Society for Gastrointestinal Endoscopy PIVI (Preservation and Incorporation of Valuable Endoscopic Innovations) on real-time endoscopic assessment of the histology of diminutive colorectal polyps. Gastrointest Endosc 2011;73:419-22.
92. Li WB, Zuo XL, Li CQ, et al. Diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric superficial cancerous lesions. Gut 2011;60:299-306.
93. Lewis S, Stableforth W, Awasthi A, Pitts N, Ottaway J, Sherwood A. et. al. An examination of the relationship between the endoscopic appearance of duodenitis and the histological findings in patients with epigastric pain. Int J Clin Exp Pathol 2012;5(6):581-587.
94. Leong RW, Nguyen NQ, Meredith CG et al. In vivo confocal endomicroscopy in the diagnosis and evaluation of celiac disease. Gastroenterology 2008; 135: 1870–1876.
95. Trovato C, Sonzogni A, Ravizza D et al. Celiac disease: in vivo diagnosis by confocal endomicroscopy. Gastrointest Endosc 2007; 65: 1096–1099.
96. Zambelli A, Villanacci V, Buscarini E et al. Confocal laser endomicroscopy in celiac disease: description of findings in two cases. Endoscopy 2007; 39: 1018–1020.

97. Turcotte JF, Wong K, Mah SJ, et al. Increased epithelial gaps in the small intestine are predictive of hospitalization and surgery in patients with inflammatory bowel disease. Clin Transl Gastroenterol 2012;3:e19.
98. Suter MJ, Gora MJ, Lauwers GY, et al. Esophageal-guided biopsy with volumetric laser endomicroscopy and laser cautery marking: a pilot clinical study. Gastrointest Endosc 2014;79:886-96.
99. Piyawattanametha W, Ra H, Qiu Z, et al. In vivo near-infrared dual-axis confocal microendoscopy in the human lower gastrointestinal tract. J Biomed Opt 2012;17:021102.
100. Tafreshi M.K., Joshi V., Meining A., Lightdale C.J., Giovannini M., Dauguet J. et al. Smart Atlas for Supporting the Interpretation of Probe-Based Confocal LASER Endomicroscopy (pCLE) of Biliary Strictures: First Classification Results of a Computer-Aided Diagnosis Software Based on Image Recognition. . Gastrointest Endosc. 2014;79(5S):AB357.