

О. А. Говорухина, Н. С. Прокопеня, А. И. Севковский,
В. М. Хомич, С. А. Сухарев, С. К. Новицкая, А. В. Заполянский,
С. К. Клецкий, Т. Е. Кузнецова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА У ДЕТЕЙ

РНПЦ детской хирургии

Цель: Сравнительный анализ диагностической значимости применения гистохимического и иммуногистохимического методов у пациентов с болезнью Гиршпрунга.

Материалы и методы. За период с 2010 по 2016 год в РНПЦ детской хирургии обследовано 465 пациентов с хроническими запорами с подозрением на болезнь Гиршпрунга в возрасте от периода новорожденности до 15 лет. Взято 892 ректальных биопсий, 776 из них подвергнуты гистохимическому исследованию, 136 – исследованию на кальретицин иммуногистохимическим методом.

Результаты. На основании анализа исследований сделан вывод, что при классической форме болезни Гиршпрунга не существует значимых различий при исследованиях ректальных биопсий гистохимическим и иммуногистохимическим методами. В связи с необходимостью забора материала для ректальной биопсии на значительном расстоянии (2–3 см) выше зубчатой линии, иммуногистохимические исследования у новорожденных имеет технические ограничения.

Кроме того, иммуногистохимическое исследование не подходит для вариантов болезни Гиршпрунга с ультракороткой зоной аганглиоза, однако при исследовании материала резецированной кишки этот метод позволяет выявить различные нарушения иннервации кишки, присущие не только болезни Гиршпрунга.

Выводы. Выбор метода гистохимического исследования зависит от формы болезни Гиршпрунга и возраста пациента. Лучший результат диагностики дает сочетание разных гистохимических методик, что позволяет успешно выявлять и своевременно оперировать детей с различными формами болезни Гиршпрунга.

Ключевые слова: болезнь Гиршпрунга, ректальная биопсия, гистохимические методы диагностики.

**O. A. Govorukhina, N. S. Prokopeny, A. I. Sevkovsky,
V. M. Khomich, S. A. Sukharev, S. K. Novitskaya,
A. V. Zapolyansky, S. K. Kletsky, T. E. Kuznetsova**

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE METHODS OF HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL USED FOR DIAGNOSIS OF HIRSCHSPRUNG DISEASE IN CHILDREN

Purpose: To conduct a comparative analysis of the diagnostic significance of the use of histochemical and immunohistochemical methods in patients with Hirschsprung disease.

Materials and methods. During the period from 2010 to 2016, 465 patients with chronic constipation with suspected Hirschsprung disease at the age of the neonatal period up to 15 years were examined

at the Children's Surgery Center. We taken 892 rectal biopsies were, 776 of them were subjected to histochemical research, 136 - to calvetinin by immunohistochemical method.

Results. Based on the analysis of the studies, it was concluded that, in the classical form of Hirschsprung's disease, there are no significant differences in studies of rectal biopsies with histochemical and immunohistochemical methods. In connection with the need to take material for rectal biopsy at a considerable distance (2-3 cm) above the dentate line, immunohistochemical studies in newborns have technical limitations.

In addition, immunohistochemical examination is not suitable for variants of Hirschsprung's disease with an ultrashort agangliosis zone, however, when examining the material of a resected bowel, this method allows to reveal various intestinal innervation disorders that are inherent not only to Hirschsprung's disease.

Conclusions. The choice of the method of histochemical examination depends on the form of Hirschsprung's disease and the age of the patient. The best result of diagnostics is given by a combination of different histochemical methods, which allows to successfully identify and timely operate children with various forms of Hirschsprung's disease.

Key words: Hirschsprung's disease, rectal biopsy, histochemical diagnostic methods.

Для обследования пациентов с подозрением на болезнь Гиршпрунга (БГ) необходимо выполнение алгоритма, включающего в себя различные диагностические методы. Это клиническое обследование, ирригоскопия, сфинктероманометрия и ректальная биопсия. БГ гистологически характеризуется сочетанием врожденного отсутствия ганглионарных клеток и гипертрофией парасимпатических нервных волокон в пораженной кишке. На выявлении каждой из этих структур при помощи окрасок различными методами базируется диагностика БГ. С применением ректальной биопсии слизистой оболочки прямой кишки процедура стала менее травматична для больного, однако более трудоемкой для патоморфологов, если использовать стандартный метод окраски гематоксилин-эозин (ГЭ). Было выявлено, что ректальная биопсия имеет высокую чувствительность (93 %) и специфичность (100 %) в диагностике БГ [1].

Развитие гистохимических (ГХ) и иммуногистохимических (ИГХ) методик значительно улучшило диагностику БГ. Диагностика БГ гематоксилин-эозин (ГЭ) окраской биопсии слизистой оболочки прямой кишки требует значительного опыта. Присутствует риск ложноположительного диагноза БГ при гипоганглиозе. Диагноз ультракороткой зоны БГ менее 3–4 см выше анального кольца не может быть выставлен при ГЭ окраске или ИГХ реакции. В отличие от ИГХ исследования или окраске ГЭ, определение фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) при ГХ реакции делает морфологическую диагностику БГ проще и более быстрой [2].

БГ при ГХ исследовании характеризуется следующими признаками: увеличением АХЭ активности парасимпатических нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки и отсутствием нервных клеток в подслизистом и мышечном сплетении (ганглионарные клетки дополнительно визуализируются ЛДГ реакцией).

Параллельное использование фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) ГХ реакции позволяет подтвердить или исключить аганглиоз в подслизистом сплетении, т. к. нервные клетки избирательно окрашиваются ЛДГ реакцией, т. о., исключается риск ложноположительного

или ложно-отрицательного результата. Использование ЛДГ реакции с визуализацией нервных клеток в подслизистом и мышечном сплетении делает возможным обнаружить и другие нарушения иннервации кишки.

Ректальная биопсия при тотальных формах БГ имеет такие же ГХ признаки, как и при классических ректо-сигмоидных формах БГ, однако низкая плотность парасимпатических нервных волокон в мышечной и собственной пластинках слизистой оболочки может означать именно тотальный аганглиоз (ТА). Достоверно прослеживается снижение плотности нервных волокон от дистального конца к проксимальному отделу толстой кишки. Тотальный аганглиоз всегда сопровождается умеренной гипоплазией экстрамуральной парасимпатической иннервации. При тотальной форме БГ в случае гипоплазии экстрамуральной парасимпатической иннервации морфометрически доказано более быстрое снижение плотности нервных волокон по сравнению с классической формой БГ. Т. е. к селезеночному углу плотность нервных волокон стремится к 0. Этим объясняется многообразие клинической картины при ТА [3]. Контрактильная сила будет зависеть от плотности нервных волокон. По эмбриологическим причинам слизистая оболочка поперечной или восходящей кишки не содержит АХЭ позитивных структур. По биопсийному материалу, взятому из поперечноободочной кишки и окрашенному ЛДГ реакцией, диагноз БГ может быть подтвержден при отсутствии нервных клеток в подслизистом или мышечном сплетениях, либо исключен при их наличии. Таким образом, диагноз БГ при окраске на АХЭ может быть получен только по биопсии, взятой из ректосигмоидного отдела. Биопсия, взятая из стомы или поперечноободочной кишки при ТА, не покажет признаков, полученных при ректальной биопсии. ИГХ метод позволяет справиться с проблемой в этом случае.

На протяжении последних 40 лет АХЭ реакция биоптата слизистой оболочки прямой кишки имеет огромное практическое значение в подтверждении диагноза БГ, являясь основным методом морфологической диагностики. В сомнительных случаях биопсия

может быть взята повторно без какого бы то ни было риска для пациента [4].

Несмотря на высокую чувствительность ГХ исследования на АХЭ, имеются сообщения как о ложноположительных, так и ложно-отрицательных результатах. Причиной ошибок могут быть нарушения техники забора биопсийного материала, транспортировки; пропитывание биоптата кровью; незрелость ферментной системы пациента и пр. Кроме того, у новорожденных ганглионарные клетки в подслизистом слое могут быть незрелыми и гиперплазия нервных волокон в собственной пластинке и мышечной пластинке слизистой оболочки может быть не выражена. Кроме того, ганглионарные клетки иногда трудно отличить от эндотелиальных и других подслизистых клеток. Другой важный фактор – ГХ исследование требует свежезамороженных тканей. Поэтому для диагностики БГ в настоящее время используются альтернативные методы, например, ИГХ исследование биоптатов, как ректальных, так и взятых из резецированной кишки.

ИГХ исследование – важный морфологический метод, который использует специфические антиген-антитело реакции [5, 6].

Основные ИГХ методы – прямая и непрямая иммунофлуоресценция или прямая и непрямая ферментная ИГХ реакция. Много ИГХ маркеров и окрасок используется для исследования и клинической диагностики БГ и других заболеваний кишечника. Кальретинин – это Ca^{++} содержащий протеин, который играет важную роль в организации и функционировании энтеральной нервной системы. Ca^{++} содержащие протеины участвуют в физиологическом кальциевом гомеостазе. Ганглионарные клетки и их производные выделяют кальретинин из подслизистого и межмышечного сплетения кишки нормальной ганглионарной кишки в отличие от аганглионарного сегмента при БГ, в котором отсутствует кальретинин. Отсутствие окраски на кальретинин в нервных отростках также показывает отсутствие кальретинина в соответствующих нервных клетках, что можно использовать как диагностический тест в диагностике аганглионарного сегмента. Важным аспектом ИГХ исследования является то, что метод позволяет обнаружить различные нарушения иннервации, т. к. окрашивает все имеющиеся клетки, даже незрелые и маленькие. Однако для выявления нервной гипертрофии необходимы другие маркеры и методы.

ИГХ исследование является современным эффективным методом, проще в заборе материала и его транспортировке (фиксируется в формалине, не нужно замораживать). Не подходит для экспресс-диагностики, однако позволяет исследовать парафиновые блоки, что важно при транспортировке материала издалека или пересмотре ранее взятых биопсий.

Выбор метода исследования во многом определяется возможностями клиники для проведения морфологических исследований пациентам.

Цель

Сравнительный анализ диагностической значимости применения ГХ и ИГХ методов у пациентов с БГ.

Материалы и методы

За период с 2010 по 2016 год в РНПЦ детской хирургии обследовано 465 пациентов с хроническими запорами с подозрением на БГ в возрасте от периода новорожденности до 15 лет. Взято 892 ректальные биопсии, в том числе 776 биопсий подвергнуты ГХ исследованию, 136 – исследованию на кальретинин ИГХ методом.

Гистохимическое исследование с определением активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) проводили по методике Karnovsky M., Roots L. (1964) [2]. Инкубацию срезов осуществляли в термостате 37 °С в течение 2 часов. Об активности фермента судили по плотности конечного продукта – ферроцианида меди.

Мы использовали ИГХ исследование на кальретинин – общий маркер.

Исследуемый биопсийный материал фиксировался в 10 %-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов.

Гистологическая проводка материала осуществлялась в автоматическом режиме с использованием гистопротессора карусельного типа Leica TP 1020 по стандартной (спирты-ксил-парафиновая среда) методике.

Инкубация с первичными антителами проводилась в течении 20 мин при комнатной температуре во влажной камере.

В качестве детекционной системы использовали систему Ultra Vision Quanto (Thermo Scientific).

Результаты и обсуждение

Диагностика БГ при гистохимическом исследовании базировалась на увеличении АХЭ активности парасимпатических нервных волокон в мышечной и собственной пластинках слизистой оболочки прямой кишки, взятой при ректальной биопсии (выявлено 92 случая болезни Гиршпрунга).

АХЭ окрашивание парасимпатических нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки отмечалось слабое в случае недоношенности (9 случаев) или при тотальной форме БГ (2 пациента); в этих

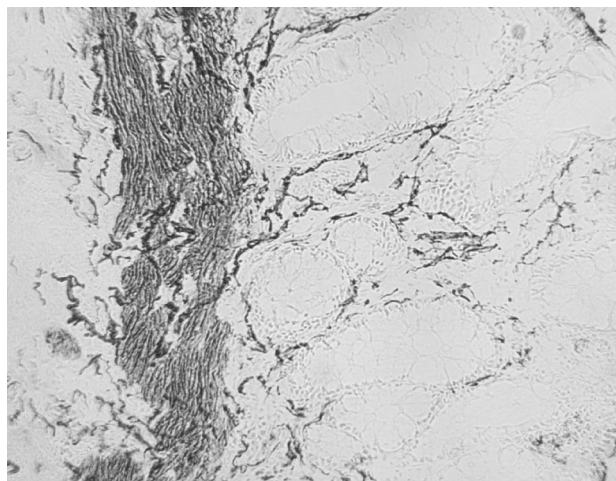


Рис. 1. Гистохимическое исследование слизистой оболочки прямой кишки на ацетилхолинэстеразу: пациент 15 мес с болезнью Гиршпрунга. Гипернервия и отсутствие нервных ганглиев в слизистой оболочке прямой кишки

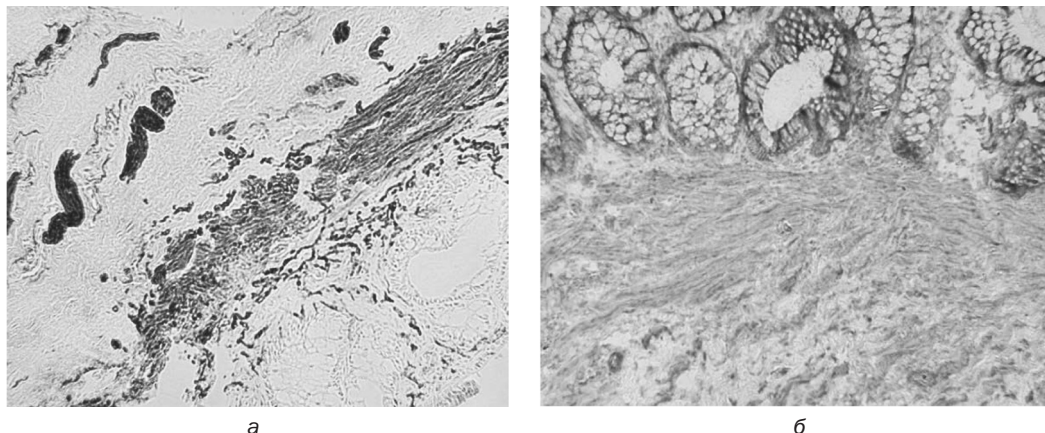


Рис. 2. Гистохимическое исследование биоптата слизистой оболочки прямой кишки пациента с болезнью Гиршпрунга 1 мес: а – на АХЭ; б – на ЛДГ

случаях нервная гипертрофия и гипернервия в биоптатах выявлена именно в мышечной пластике слизистой оболочки. Кроме того, параллельное использование фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) ГХ реакции позволило подтвердить аганглиоз в подслизистом сплетении (всего 7 случаев).

БГ при ИГХ исследовании характеризуется отрицательной реакцией на кальретинин (34 пациента). В 10 сомнительных случаях этим пациентам было выполнено гистохимическое исследование на АХЭ: была выявлена гипертрофия нервных волокон и отсутствие нервных клеток; т. е. болезнь Гиршпрунга была подтверждена.

У 102 пациентов при ИГХ исследовании реакция на кальретинин была положительной, т. е. болезнь Гиршпрунга исключена. Однако в 6 случаях реакция была слабо положительной, что потребовало дополнительно провести ГХ исследование на АХЭ; гипертрофии нервных волокон не было выявлено ни в собственной, ни в мышечной пластинках слизистой оболочки прямой кишки; были выявлены немногочисленные небольшие нервные ганглии. Таким образом, болезнь Гиршпрунга была исключена.

Анализ собственных наблюдений позволяет сделать вывод, что мы не нашли существенной разницы

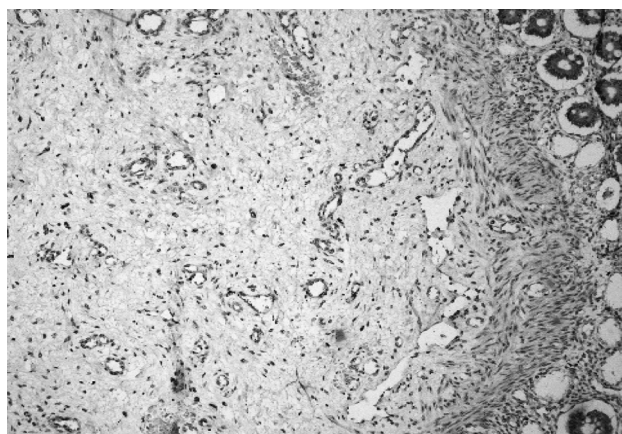


Рис. 3. Болезнь Гиршпрунга, пациент 9 мес, ректальная биопсия: Отсутствие экспрессии кальретинина при иммуногистохимическом исследовании. Ув. 125

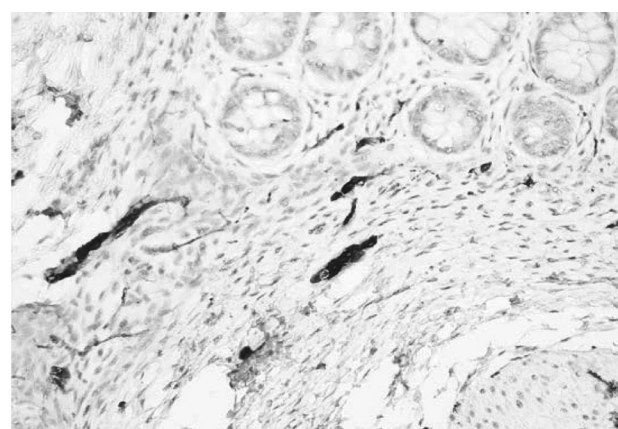


Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление кальретинина в клетках нервных ганглиев и их отростках в биоптате слизистой оболочки прямой кишки при нормальной её иннервации. Пациент 13 мес. Ув. 125

в качестве диагностики БГ при ректальных биопсиях при использовании ГХ и ИГХ методов в классических случаях БГ у пациентов старше 3 лет. ГХ метод позволяет быстро получить результат при диагностике БГ. ИГХ метод при ректальных биопсиях требует более глубокого забора материала, в 3–4 см выше зубчатой линии (по данным литературы в норме на протяжении до 2–3 см от анального кольца ганглионарные клетки могут не определяться), что технически ограничивает его использование у новорожденных пациентов. ИГХ исследование дольше по времени. ИГХ исследование не подходит для ультракоротких форм БГ. Однако

Таблица. Анализ количества сомнительных ответов при различных методах исследования в зависимости от возраста пациента

Возраст пациента	Гистохимия (АХЭ, ЛДГ)			Иммуногистохимия (кальретинин)		
	биопсий	сомнительные	%	биопсий	сомнительные	%
До 1 мес	104	9	8,6	8	5	62,5
1 мес – 3 года	389	2	0,51	56	9	16,1
Старше 3 лет	283	0	0	72	2	2,8
Всего	776	11	1,41	136	16	11,8

при исследовании материала резецированной кишки ИГХ метод позволяет выявить различные нарушения иннервации кишки, не только БГ. Произведен пересмотр гистологического материала (стекла, парафиновые блоки) в 5 случаях из областных клиник с помощью ИГХ исследования – на исследуемых участках толстой кишки аганглиоз был исключен.

Таким образом, анализ собственных результатов, а также данные литературы позволяют утверждать, что для каждой формы БГ и уровня биопсии необходимы различные методы морфологического исследования. Знание проблемы определит нужный выбор.

Анализ наблюдений показал, что невозможно отказаться от одной из методик в пользу другой. БГ – сложное хирургическое заболевание, верификация которого возможна только гистологически. Разные формы заболевания требуют разных подходов как в диагностике, так и в дальнейшем хирургическом лечении. Выбор метода хирургического лечения во многом будет зависеть от правильно выставленного диагноза. Только индивидуальный подбор и использование различных методик может способствовать успешной диагностике БГ у детей.

Литература

1. *Holschneider, A. M., Puri P., eds. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders (ed 3). New York, NY: Springer, 2008: 414 pp.*
2. *Karnovsky, M., Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases // J. Histochem Cytochem. 1964; 12:219–21.*
3. *Broderson, S. H., Westrum L. E., Sutton A. E. Studies of the direct coloring thiocholine method for localizing cholinesterase activity // Histochemistry. 1974 Jun 26; 40(1):13–23.*
4. *Agrawal, R. K., Kakkar N., Vasishta R. K., Kumari V., Samujh R., Rao K. L. Acetylcholinesterase histochemistry (AChE) – A helpful technique in the diagnosis and in aiding the operative procedures of Hirschsprung disease. Diagn Pathol. 2015 Dec 2; 10:208.*
5. *De la Torre, L, Santos K. Hirschsprung disease. Evaluation of calretinin and S-100 as ancillary methods for the diagnosis of aganglionosis in rectal biopsies. Acta Pediatr. Mex. 2012; 33(5): 246-251.*
6. *Holland, S. K., Ramalingam P., Podolsky R. H., Reid-Nicholson M. D., Lee J. R. Calretinin immunostaining as an adjunct in the diagnosis of Hirschsprung disease // Ann Diagn Pathol 2011; 15: 323–8.*