



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57532 (13) U
(51) МПК
G01N 1/28 (2011.01)
G01N 33/48 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГЛЮТЕНОВОЇ ЕНТЕРОПАТІЇ

1

(21) u201100261

(22) 10.01.2011

(24) 25.02.2011

(46) 25.02.2011, Бюл.№ 4, 2011 р.

(72) КІЛЕССА ОЛЕКСАНДР ВОЛОДИМИРОВИЧ,
ФІЛОНЕНКО ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА, ЗАГОРУЛЬКО
ОЛЕКСАНДР КИМОВИЧ

(73) КІЛЕССА ОЛЕКСАНДР ВОЛОДИМИРОВИЧ,
ФІЛОНЕНКО ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА

(57) Спосіб діагностики глютенкової ентеропатії, що включає проведення гістологічного дослідження з використанням рутинного забарвлення матеріалу гематоксилін-еозинном, визначення наявності міжепітеліальних лімфоцитів та проліферації ентероцитів крипт, який **відрізняється** тим, що додатково проводять імуногістохімічне дослідження біоптату слизової оболонки дванадцятипалої кишки з моноклональними антитілами до Т-лімфоцитів

2

та моноклональними антитілами Ki-67, обчислюють індекси експресії CD3+ лімфоцитів, CD8+ лімфоцитів, індекс проліферації Ki-67 ентероцитів, та при значенні індексів CD3+ і CD8+ від 30 % до 70 %, а індексу Ki-67 від 10 % до 15 % судять про наявність інфільтративної стадії глютенкової ентеропатії, при величині індексів CD3+ і CD8+ 30-70 % та індексу Ki-67 -16-50 % судять про наявність гіперпластичної стадії глютенкової ентеропатії, при величині індексів CD3+ і CD8+ у межах 70-80 % і індексу Ki-67 у межах 50-70 % судять про наявність атрофічної стадії глютенкової ентеропатії, а при величині індексу експресії CD3+лімфоцитів у стромі 30-70 %, індексу експресії CD8+лімфоцитів у стромі 5-10 % та індексу проліферації Ki-67 ентероцитів 10-30 % судять про наявність хронічного дуоденіту.

Корисна модель стосується медицини, а саме - патологічної анатомії і може бути використана для морфологічної діагностики глютенкової ентеропатії в біоптатах слизової оболонки дванадцятипалої кишки.

Як найближчий аналог вибраний спосіб діагностики глютенкової ентеропатії (Marsh M.N., Crowe P.T. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity // Ballieres Clinical Gastroenterology. - 1995. - Jun(9)2 - P.273-293), що включає визначення кількості міжепітеліальних лімфоцитів, проліферації епітелію крипт та атрофії ворсин залежно від стадії глютенкової ентеропатії в слизистій оболонці дванадцятипалої кишки в гістологічних препаратах з використанням рутинного забарвлення гематоксилін-еозинном.

Ознаками, які співпадають із суттєвими ознаками запропонованого способу, є: проведення гістологічного дослідження з використанням рутинного забарвлення матеріалу гематоксилін-еозинном, визначення наявності міжепітеліальних лімфоцитів та проліферації ентероцитів крипт.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення

точності діагностики), є: труднощі підрахунку міжепітеліальних лімфоцитів, відсутність інформації щодо фенотипу лімфоцитів, індексу проліферації ентероцитів, а у зв'язку з цим невисока точність діагностики, що може призводити до постановки помилкового діагнозу та проведення неадекватного лікування, так як при гістологічному дослідженні біоптату дванадцятипалої кишки з використанням забарвлення гематоксилін-еозинном неможливо визначити кількісний вміст міжепітеліальних лімфоцитів, проліферацію ентероцитів крипт, а тому частіше за все достовірно патоморфолог діагностує тільки пізню стадію глютенкової ентеропатії, що проявляється атрофією ворсин дванадцятипалої кишки, а ранні стадії глютенкової ентеропатії - інфільтративну і гіперпластичну часто визначити не вдається, у зв'язку з чим великий відсоток ранніх стадій глютенкової ентеропатії не виявляється, а отже, пацієнт не отримує адекватної патогенетичної терапії.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу-найближчого аналога шляхом додаткового проведення імуногістохімічного дослідження з подальшим визначенням кіль-

(13) U

(11) 57532

(19) UA

кості міжепітеліальних лімфоцитів, фенотипу лімфоцитів, їх локалізації, індексу проліферації ентероцитів крипт ворсин слизової оболонки дванадцятипалої кишки, що дозволяє судити про наявність глютенкової ентеропатії залежно від стадії патологічного процесу, а отже підвищити точність діагностики та призначати відповідний курс терапевтичних заходів, що сприяє зменшенню ускладнень, тобто дозволяє досягти очікуваного технічного результату.

Поставлена задача рішається тим, що в собі діагностики глютенкової ентеропатії, що включає проведення гістологічного дослідження з використанням рутинного забарвлення матеріалу гематоксилін-еозином, визначення наявності міжепітеліальних лімфоцитів та проліферації ентероцитів крипт, згідно корисної моделі, додатково проводять імуногістохімічне дослідження біоптату слизової оболонки дванадцятипалої кишки з моноклональними антитілами до Т-лімфоцитів та моноклональними антитілами Ki-67, обчислюють індекси експресії CD3+ лімфоцитів, CD8+ лімфоцитів, індекс проліферації Ki-67 ентероцитів, та при значенні індексів CD3+ і CD8+ від 30% до 70%, а індексу Ki-67 від 10% до 15% судять про наявність інфільтративної стадії глютенкової ентеропатії, при величині індексів CD3+ і CD8+ 30-70% та індексу Ki-67 - 16-50% судять про наявність гіперпластичної стадії глютенкової ентеропатії, при величині індексів CD3+ і CD8+ у межах 70 - 80% і індексу Ki-67 у межах 50-70% судять про наявність атрофічної стадії глютенкової ентеропатії, а при величині індексу експресії CD3+лімфоцитів у стромі 30-70%, індексу експресії CB8+лімфоцитів у стромі 5-10% та індексу проліферації Ki-67 ентероцитів 10-30% судять про наявність хронічного дуоденіту.

Між сукупністю суттєвих ознак заявляемого способу і технічним результатом, який може бути досягнутий, проявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: додаткове проведення імуногістохімічного дослідження слизової оболонки дванадцятипалої кишки з моноклональними антитілами та визначення індексів експресії CD8+ лімфоцитів і CD3+ лімфоцитів, індексу проліферації Ki-67 ентероцитів дозволяє при певних їх значеннях судити про наявність глютенкової ентеропатії залежно від стадії патологічного процесу, що в свою чергу дозволяє значно покращити морфологічну діагностику глютенкової ентеропатії та провести диференційну діагностику з хронічним дуоденітом, що сприяє розробці адекватних принципів патогенетичної терапії, профілактиці ускладнень, а також оцінці ефективності лікування.

Спосіб діагностики глютенкової ентеропатії полягає в наступному.

Хворому з диспептичними розладами та анемією неясної етіології проводять відеоендоскопію з використанням технології високого оптичного збільшення і високого дозволу з режимом вузькоспектральної візуалізації, досліджують стан ворсинчастих структур слизової оболонки дванадцятипалої кишки і проводять топічний забір гістологічного матеріалу змінених ділянок.

Далі проводять гістологічне дослідження за допомогою світлової мікроскопії за стандартною

методикою із забарвленням матеріалу гематоксиліном і еозином. При цьому можуть бути виявлені кілька типів патологічних процесів, які мають специфічну морфологічну картину.

Потім проводять імуногістохімічне дослідження біоптату слизової оболонки дванадцятипалої кишки за стандартною методикою з використанням парафінових блоків і реактивів компанії DAKO з моноклональними антитілами до CD8+ лімфоцитів - Clone C8/144B, CD3+ лімфоцитів - Clone F7.2.38, моноклональними антитілами Ki-67 - Clone MIB-1 і системи візуалізації FLEX, - на аутостейнері фірми DAKO. Фотографування здійснюють цифровою камерою OLYMPUS C 5050Z, установленою на мікроскопі OLYMPUS CX 41.

Оцінку рівня експресії CD8+ лімфоцитів, CD3+ лімфоцитів і індексу проліферації Ki-67 проводять з урахуванням інтенсивності забарвлення і розподілу моноклональних антитіл у процентному еквіваленті.

Обчислюють Індекси експресії CD8+ лімфоцитів, CD3+ лімфоцитів та за їх величиною судять про наявність міжепітеліальних лімфоцитів та лімфоцитів у стромі.

Обчислюють індекс проліферації Ki-67 ентероцитів та за його величиною судять про наявність проліферативної активності в ентероцитах крипт ворсин.

На підставі одержаних результатів диференціюють і діагностують стадію глютенкової ентеропатії і призначають відповідну терапію.

При значенні індексів експресії CD8+лімфоцитів, CD3+ лімфоцитів від 30% до 70%, а індексу проліферації Ki-67 ентероцитів від 10% до 15% судять про наявність інфільтративної стадії глютенкової ентеропатії.

При величині індексів експресії CD8+лімфоцитів, CD3+ лімфоцитів від 30% до 70% та індексу проліферації Ki-67 ентероцитів від 16% до 50% судять про наявність гіперпластичної стадії глютенкової ентеропатії.

При величині індексів експресії CD8+лімфоцитів, CD3+ лімфоцитів у межах 70 - 80% і Індексу проліферації Ki-67 ентероцитів у межах 50-70% судять про наявність атрофічної стадії глютенкової ентеропатії.

При величині індексу експресії CD3+лімфоцитів у стромі від 30% до 70%, а індексу експресії CB8+лімфоцитів у стромі від 5% до 10% і величині індексу проліферації Ki-67 ентероцитів 10-30% судять про наявність хронічного дуоденіту.

Застосування даного способу діагностики дозволяє здійснювати належну оцінку морфологічного, фенотипового та проліферативного стану слизової оболонки дванадцятипалої кишки та скоректувати патогенетичну терапію залежно від одержаних результатів.

Даний спосіб був використаний у 324 пацієнтів.

У 197 пацієнтів було діагностовано хронічний дуоденіт різного ступеня активності запалення. Індекс експресії CD3+ лімфоцитів в стромі був у межах 30-70%. Індекс експресії CD8+ лімфоцитів у міжепітеліальній зоні і стромі був у межах 5%-10%.

Індекс проліферації Ki-67 в ентероцитах крипт був у межах 10-30%.

У 127 було діагностовано глютенічна ентеропатія різної стадії залежно від загальноприйнятої класифікації Marsh.

У 67 пацієнтів діагностована інфільтративна стадія глютенічної ентеропатії. Індекс експресії CD8+лімфоцитів у міжепітеліальній зоні був у межах 30-70%, в стромі - у межах 5%-10%. Індекс проліферації Ki-67 ентероцитів склав 10-15%. Високий відсоток CD8+ лімфоцитів і низький індекс проліферації Ki-67 ентероцитів свідчать на користь інфільтративної стадії глютенічної ентеропатії.

У 38 пацієнтів була діагностована гіперпластична стадія глютенічної ентеропатії, основною ознакою якої є не тільки наявність міжепітеліальних лімфоцитів, а й проліферація епітелію крипт. При цьому індекс експресії Ki-67 ентероцитів склав 16-50%. Індекс експресії CD8+лімфоцитів у міжепітеліальній зоні був у межах 30-70%, а в стромі - від 5% до 10%.

У 22 пацієнтів діагностована атрофічна стадія глютенічної ентеропатії. При цьому спостерігалась висока експресія CD8+ міжепітеліальних лімфоцитів, тобто індекс експресії CD8+ був від 70% до 80%, в стромі -30 - 50%, а індекс проліферації Ki-67 ентероцитів склав 50 - 70%.

Пацієнтам залежно від одержаних результатів була призначена відповідна терапія.

Віддалені результати свідчать про ефективність проводимої діагностики.

Грунтуючись на певних особливостях патогенезу і причинах утворення глютенічної ентеропатії, у лікарській тактиці слід базуватися на своєчасній діагностиці інфільтративної і гіперпластичної стадій глютенічної ентеропатії та проведенні необхідної терапії. Це дозволить, коли процес ще оборотний, уникнути виникнення ускладнень.

Заявлений спосіб діагностики глютенічної ентеропатії, підтверджується наступними прикладами.

Приклад 1.

Хвора А., вік 22 роки. Клінічна картина захворювання, попередні результати обстежень, вимагають проведення диференційної діагностики між хронічним дуоденітом і глютенічною ентеропатією. Після проведення діагностики запропонованим способом були одержані наступні результати.

Результати гістологічного дослідження із забарвленням гематоксиліном і еозином: фрагменти слизової дванадцятипалої кишки орієнтовані. Архітектоніка ворсин збережена. Співвідношення висоти ворсини до крипти 3:1 і вище. Ентероцити збережені. Візуалізуються одиничні міжепітеліальні лімфоцити. В стромі власної пластинки слизової - помірно-виражена лімфоцитарна інфільтрація. Для диференційної діагностики хронічного дуоденіту і глютенічної ентеропатії рекомендовано імуногістохімічне дослідження.

Результат імуногістохімічного дослідження: індекс проліферації Ki-67 -10% в ентероцитах крипт - норма, індекс експресії CD3+ - 50% міжепітеліальні лімфоцити, 5% в лімфоцитах стромі, індекс експресії CD8+ -50% в епітелії, 5% - в лімфоцитах стромі.

Заключення: Гістологічні та імуногістохімічні ознаки відповідають інфільтративній стадії глютенічної ентеропатії.

З урахуванням одержаних даних пацієнту була призначена безглютенічна дієта.

Після проведеного лікування клінічні симптоми глютенічної ентеропатії відсутні у 95% .

Приклад 2.

Хворий Я., вік 28 років. Клінічна картина захворювання у даного хворого, попередні результати обстежень, вимагають проведення диференційної діагностики змін у дванадцятипалій кишці з хронічним дуоденітом і глютенічною ентеропатією. Після проведення діагностики запропонованим способом були одержані наступні результати.

Результати гістологічного дослідження із забарвленням гематоксиліном і еозином: фрагменти слизової дванадцятипалої кишки орієнтовані. Архітектоніка ворсин збережена. Співвідношення висоти ворсини до крипти 3:1 і вище. Ентероцити збережені. Візуалізуються одиничні помірно-виражена лімфоцитарна інфільтрація з домішкою нейтрофілів і еозинофілів, набряк стромі ворсин, що є ознакою слабкоактивного хронічного дуоденіту. Для диференційної діагностики хронічного дуоденіту і глютенічної ентеропатії рекомендовано імуногістохімічне дослідження.

Результат імуногістохімічного дослідження: індекс проліферації Ki-67 -30% в ентероцитах крипт, індекс експресії CD3+ - 40% міжепітеліальні лімфоцити, 20% в лімфоцитах стромі, індекс експресії CD8+ - 40% міжепітеліальні лімфоцити, 7% в лімфоцитах стромі.

Заключення: Гістологічні та імуногістохімічні ознаки відповідають гіперпластичній стадії глютенічної ентеропатії на тлі слабковираженого хронічного дуоденіту.

З урахуванням одержаних даних пацієнту була призначена безглютенічна дієта.

Після проведеного лікування клінічні симптоми глютенічної ентеропатії відсутні у 82% .

Приклад 3.

Хворий У. вік 46 років. Клінічна картина захворювання і дані попередніх результатів вимагають проведення диференційної діагностики змін слизової дванадцятипалої кишки з хронічним дуоденітом і глютенічною ентеропатією. Після проведення діагностики запропонованим способом були одержані наступні результати. Результати гістологічного дослідження із забарвленням гематоксиліном і еозином: Фрагменти слизової дванадцятипалої кишки орієнтовані. Мають ознаки хронічного слабко активного дуоденіту з атрофією, співвідношення висоти ворсини до крипти 1:1, візуалізуються міжепітеліальні лімфоцити і десквамація ентероцитів, проліферація крипт ентероцитів, різке зменшення келихоподібних клітин, виражена лімфоцитарна інфільтрація в стромі з домішкою нейтрофілів і еозинофілів. Для диференційної діагностики хронічного дуоденіту і глютенічної ентеропатії рекомендовано імуногістохімічне дослідження.

Результат імуногістохімічного дослідження: індекс проліферації Ki-67 -60% в ентероцитах крипт, індекс експресії CD3+ - 60% міжепітеліальні лімфоцити, 10% в лімфоцитах стромі, індекс експресії

сії CD8+ - 60% міжепітеліальні лімфоцити, 5% в лімфоцитах стромы.

Заключення: Патологічний процес відповідає атрофічній стадії глютенкової ентеропатії.

З урахуванням одержаних даних пацієнту було призначено безглютенова дієта.

Після проведеного лікування клінічні симптоми глютенкової ентеропатії відсутні у 68%.

Застосування заявляемого способу дозволяє покращити диференційну діагностику глютенкової

ентеропатії і сприяє розробці адекватних принципів терапії, а також профілактиці ускладнень і прогнозуванню рецидивів даної патології.

Запропонований спосіб простий у застосуванні, є ефективним, не має побічної дії і може використовуватися для диференційної діагностики глютенкової ентеропатії, дозволяє рекомендувати його до широкого поширення і використання в клінічній і патоморфологічній практиці.