

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА

¹Говорухина О.А., ¹Прокопеня Н.С., ¹Харитончик В.А., ²Новаковская С.А.,
²Кузнецова Т.Е., ³Клецкий С.К.

¹Республиканский научно-практический центр детской хирургии, ²Институт физиологии Национальной академии наук Республики Беларусь, ³Городское клиническое патологоанатомическое бюро, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: govorukhina@mail.ru

Для цитирования:

Говорухина О.А., Прокопеня Н.С., Харитончик В.А., Новаковская С.А., Кузнецова Т.Е., Клецкий С.К. Особенности морфологической диагностики болезни Гиршпрунга. *Морфологические ведомости*. 2024; 32(1):818. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32\(1\).818](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32(1).818)

Резюме. Болезнь Гиршпрунга – сложное хирургическое заболевание, верификация которого возможна только гистологическими методами. Это заболевание относится к группе нейрокринопатий, которая включает не только аганглиоз толстой кишки, но и другие виды нарушений ее структурной организации, лечебно-диагностическая тактика при которых остается до сих пор спорной. Цель исследования – выявить морфологические изменения в стенке толстой кишки различными методами исследования, необходимыми для диагностики, хирургической коррекции и прогнозирования результатов лечения болезни Гиршпрунга. Настоящее исследование выполнено на материалах 119 пациентов детского возраста для проведения проспективного анализа результатов их лечения. Среди них был 91 пациент мужского пола и 28 женского пола. Пациентам были выполнены гистохимическое, иммуногистохимическое, электронно-микроскопическое исследования толстой кишки, световая микроскопия нативных препаратов для экспресс-биопсии и послеоперационного материала с окраской гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование биоптатов толстой кишки свидетельствовало о наличии дегенеративных процессов во всех оболочках толстой кишки, на развитие которых влияет не только полное отсутствие интрамуральных нейронов в зоне аганглиоза, но и гипоплазия интрамуральных нервных волокон и сплетений на всем протяжении толстой кишки. Полученные данные об изменениях в оболочках толстой кишки проксимальнее зоны аганглиоза свидетельствуют как о первичной гипоплазии структур нервной, эндокринной и иммунной систем в оболочках кишки, так и вторичных дегенеративных изменениях, развивающихся у пациентов с возрастом. Выявленные изменения в структурах ганглиев толстого кишечника при болезни Гиршпрунга не всегда могут объяснить функциональные результаты, связанные с моторикой кишечника, даже после успешного хирургического лечения. Указанные изменения также объясняют возникновение энтероколитов как в до-, так и в послеоперационном периоде. Нарушения в структурах иммунной системы являются причиной возникновения рецидивирующих энтероколитов. Анализ собственных результатов позволяет утверждать, что для каждой формы болезни Гиршпрунга и вида биопсии необходимы соответствующие методы морфологического исследования.

Ключевые слова: толстая кишка, болезнь Гиршпрунга, биопсия, морфология, гистологическое исследование

Статья поступила в редакцию 15 августа 2023

Статья принята к публикации 20 мая 2024

FEATURES OF THE MORPHOLOGICAL DIAGNOSTICS OF HIRSCHSPRUNG'S DISEASE

¹Govorukhina OA, ¹Prokopenya NS, ¹Kharitonchik VA, ²Novakovskaya SA,
²Kuznetsova TE, ³Kletsky SK

¹Republican Scientific and Practical Center for Children's Surgery, ²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus Republic, ³City Clinical Pathology Bureau, Minsk, Republic of Belarus, e-mail: govorukhina@mail.ru

For the citation:

Govorukhina OA, Prokopenya NS, Kharitonchik VA, Novakovskaya SA, Kuznetsova TE, Kletsky SK. Features of the morphological diagnostics of Hirschsprung's disease. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter*. 2024;32(1):818. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32\(1\).818](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2024.32(1).818)

Summary. Hirschsprung's disease is a complex surgical disorder that requires histological methods to be verified. This disease is part of the neurocristopathies group, which encompasses colon aganglionosis and other structural disorders, about their treatment and diagnostic tactics are still unresolved. The purpose of the study is to identify morphological changes in the colon wall by using a variety of research methods necessary for diagnosing, surgical correction, and predicting treatment results for Hirschsprung's disease. A prospective analysis of their treatment results was performed on the materials of 119 pediatric patients in this study (91 – boys, 28 – girls). Histochemical, immune-histochemical, and electron microscopic methods were performed on the patients' biopsies of colon, along with light microscopy for express biopsy and postoperative material stained with hematoxylin and eosin. Morphological analysis of colon biopsy specimens revealed the presence of degenerative processes in all colon layers, which led to the changes of its structures. Intramural nerve fibers and plexuses throughout the colon were hypoplastic and the complete absence of intramural neurons in the aganglionosis zone is what causes this change. The findings on the changes in the colon layers close to the aganglionosis zone suggest that the neuromuscular, endocrine, and immune system structures in the intestinal membranes are undergoing primary hypoplasia. Secondary degenerative changes also occur in patients with age. Despite successful surgical treatment, functional results associated with intestinal motility in Hirschsprung's disease may not always be satisfactory, as evidenced by changes in the structures of intestinal ganglia. The occurrence of enterocolitis is also explained by these changes, both during and after surgery. Our own results allow us to state that diverse morphological examination methods are necessary for different forms of Hirschsprung's disease and biopsy types.

Keywords: colon, Hirschsprung's disease, biopsy, morphology, histological examination

Article received 15 August 2023

Article accepted 20 May 2024

Введение. Болезнь Гиршпрунга (далее - БГ) – комплексная генетическая патология, нейрокринопатия, характеризующаяся остановкой нормальной миграции нервно-гребешковых клеток и(или) их дифференцировки на протяжении всей толстой кишки [1]. Накопление больших клинических серий и опыта в крупных специализированных клиниках показывает, что группа нейрокринопатий является гораздо более неоднородной, чем было принято считать ранее, и включает не только аганглиоз толстой кишки, но и другие виды нарушений ее структурной организации, при которых лечебно-диагностическая тактика остается до сих пор спорной [2-4]. Для обследования пациентов с БГ необходим диагностический алгоритм, включающий различные морфологические методы [5-7]. БГ гистологически характеризуется одновременно врожденным отсутствием ганглионарных клеток и гипертрофией парасимпатических нервных волокон в пораженной кишке. На выявлении каждой из этих структур различными методами базируется морфологическая диагностика БГ [8]. Выявлено, что ректальная биопсия имеет высокую чувствительность (93%) и специфичность (100%) в диагностике БГ [9-11]. С применением ректальной биопсии слизистой оболочки прямой кишки процедура диагностики заболевания стала менее травматичной для пациентов, в сомнительных случаях биопсия может быть произведена повторно без какого бы то ни было риска для пациентов [12-13]. Однако, исследование ректальных биоптатов для диагностики БГ представляет собой более трудоемкий процесс для патоморфологов в случае использования стандартного метода окраски гематоксилином и эозином. Развитие гистохимических и иммуногистохимических технологий значительно улучшило диагностику БГ [14-17]. Использование различных методов морфологического исследования как ректальных биоптатов, так и биоптатов стенки ободочной кишки при БГ позволяет не только быстро и точно поставить диагноз, определить объем и вид оперативного вмешательства, но и прогнозировать результаты хирургического

лечения пациентов. Электронно-микроскопическое исследование позволяет выявить ультраструктурные особенности стенки кишки, отражающие распространенность патологического процесса при БГ как в аганглионарном участке толстой кишки, так и в ганглионарных ее отделах.

Цель исследования: выявить морфологические изменения в стенке толстой кишки различными методами исследования, необходимыми для диагностики, хирургической коррекции и прогнозирования результатов лечения БГ.

Материалы и методы исследования. Настоящее исследование выполнено на 119 пациентов детского возраста с БГ для проведения проспективного анализа результатов их лечения. Среди них был 91 пациент мужского пола и 28 женского. Структурная организация биоптатов слизистой оболочки прямой кишки изучена с использованием гистохимического метода El-Badavi et Schank (1967) на активность фермента ацетилхолинэстеразы (далее - АХЭ) [18]. Активность АХЭ определяли в модификации этого метода по Karnovsky et Roots (1964) [19]. Для проведения указанного гистохимического исследования биоптат кишки устанавливали на охлажденный металлический блок и помещали в криостат при -25°C на 30 минут для замораживания. Затем в криостате готовили серийные замороженные срезы толщиной 10 мкм, которые наклеивали на охлажденные покровные стекла и после просушки фиксировали в течение 30 минут в 4% растворе нейтрального формалина. После промывания в дистиллированной воде срезы погружали на 1,5 часа в инкубационную среду.

Метод иммуногистохимии применялся для определения концентрации кальретицина в гистологическом материале по следующему методу. Исследуемый материал фиксировался в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Гистологическая проводка материала осуществлялась в автоматическом режиме с использованием гистопроцессора карусельного типа Leica TP 1020. Материал заливался в парафиновую среду для микротомирования. При помощи ротаци-

онного электромеханического микротоме «Microm HM340E» приготавливались срезы толщиной 3 мкм, которые монтировались на высокоадгезивные стекла (Super Frost Plus, Thermo Scientific) и подсушивались в течение 12 часов при температуре 37°C, затем 1 час при 60 °C. Стекла с адгезированными срезами депарафинировались в трех сменах ксилола, пяти сменах спиртов нисходящей концентрации. Для нивелирования антиген-маскирующего действия формалиновой фиксации срезы проходили высокотемпературную предобработку в Tris/EDTA буфере pH 9,0 в течение 20 минут при температуре 98°C, обрабатывались 3% перекисью водорода для блокировки эндогенной пероксидазы в течение 10 минут. Инкубация с первичными антителами (моноклональные кроличьи антитела к кальретинину, клон SP13, готовый к использованию раствор производства Thermo Scientific) производили в течение 20 минут при комнатной температуре во влажной камере. В качестве детекционной системы использовали систему Ultra Vision Quanto (Thermo Scientific). Окрашенные препараты исследовались в проходящем свете с помощью микроскопа Leica DM 2500, при необходимости микрофото съемка проводилась микрофотокамерой Leica DFC425.

Для исследования материала интраоперационных экспресс-биопсий его помещали в пробирки, замороженные в лед, и отправляли на гистологическое исследование и световую микроскопию нативных препаратов с окрашиванием криостатных срезов гематоксилином и эозином. Производился забор полнослойных биоптатов размером 3х3 мм с ушиванием стенки кишки на 3-4 уровнях толстой кишки. После взятия биопсий время ожидания ответа занимало не более 1 часа. При получении ответа о наличии ганглиев толстая кишка пересекалась в месте взятия биопсии и накладывался колоанальный анастомоз. После заморозки была произведена резка биопсийного материала на криостате HM 525 (Германия) и приготовлены срезы толщиной 8 мкм, которые после окрашивания гематоксилином и эозином были просмотрены в световом микроскопе Optec BK 5000, оснащенного

цифровой камерой (Optec, Китай). Во время гистологического исследования биоптатов толстой кишки определялось не только наличие и достаточное количество ганглиев на единицу площади (более 40 на 1 квадратный мм), но и их размеры, степень зрелости, наличие структурных изменений ганглионарных клеток.

Морфологическое исследование тканей, которые были удалены во время хирургического вмешательства, фиксировали в 10% растворе буферного формалина, затем заливали в парафин по стандартному методу. После проводки в спиртах возрастающей концентрации материал проводили через спирт-хлороформ, хлороформ, хлороформ-парафин и заливали в парафин и на ротационном микротоме Microm HM 340E (Microm International GmbH., Germany) готовили серийные срезы толщиной 1–3 микрона, с последующей окраской препаратов гематоксилином и эозином для проведения обзорной микроскопии тканевых срезов. Оценка морфологических параметров была проведена с использованием светового оптического микроскопа Leica DM5000B с цифровой камерой DFC 420C при увеличении 2×12,5, ×50, ×200, ×400 (Leica Camera AG, Germany).

Гистологическая картина оценивалась на микроскопе Olympus BX 51 (Olympus Ltd Co, Japan). Микрофотографии с компьютерной обработкой были выполнены фотокамерой Olympus U-TV1X-2 (Olympus Ltd Co, Japan). Субмикроскопическая организация слизистой оболочки в биоптатах кишки изучена электронно-микроскопическими методами. Для этого биоптат кишки погружали в фиксирующий раствор 2,5% глутарового альдегида на 2 часа при 4°C. Затем материал измельчали и повторно фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия в течение 2 часов при 4°C. После завершения альдегид-осмиевой фиксации материал обезживали в спиртах восходящей крепости и заливали в аралдит по схеме, изложенной в руководстве Н.Н. Боголепова [20]. Материал, залитый в капсулы с аралдитом, для полимеризации помещали в термостат при 37°C, затем при 56°C на 2 суток. Срезы готовили на ультратоме мар-

ки LKB, контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM 100B и JEM 100CX.

Результаты и обсуждение. Всем 119 пациентам в исследуемых группах было выполнено гистохимическое исследование биоптатов слизистой прямой кишки на активность АХЭ. Реакция на АХЭ является патогномоничным признаком для БГ. БГ характеризуется увеличением АХЭ активности парасимпатических нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки прямой кишки (рис. 1). При морфологическом исследовании трудности диагностики связаны с незрелостью нервного аппарата кишки и сложностью интерпретации данных у новорожденных. Ошибки могут быть при заборе материала и его транспортировке. У новорожденных первых дней жизни ложноположительный или ложноотрицательный результат может быть связан с незрелостью нервных структур кишки. В 4-х случаях при сомнительном диагнозе биопсия была произведена повторно через 1 месяц (рис. 2), диагноз БГ был подтвержден. В препаратах, полученных от недоношенных пациентов отмечалось слабое окрашивание парасимпатических нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки. В этих случаях гипертрофия нервных волокон и увеличение их числа в биоптатах выявля-

ны исключительно в мышечной пластинке слизистой оболочки. Кроме того, параллельное выявление активности фермента лактатдегидрогеназы (далее - ЛДГ) позволило подтвердить аганглиоз в подслизистом сплетении (3 случая, рис. 3, рис. 4). Выбор метода исследования во многом определяется возможностями клиники для проведения морфологических исследований пациентам. В настоящем исследовании также использовали иммуногистохимический метод исследования кишки на выявление кальренина - связывающего кальций белка, который синтезируется в функционирующих интрамуральных ганглиях толстой кишки. Это исследование было произведено 63 пациентам (рис. 5, рис. 6). БГ характеризуется отрицательной реакцией на кальренин (48 пациентов, рис. 7, рис. 8). В двух сомнительных случаях этим пациентам было выполнено гистохимическое исследование на АХЭ, выявлена гипертрофия нервных волокон и отсутствие нервных клеток, то есть диагноз БГ был подтвержден. У 15 пациентов, которые были исключены из основной группы, реакция на кальренин была положительной, т.е. диагноз БГ был исключен (рис. 8). Однако в 3 случаях реакция была слабо положительной, что потребовало дополнительного проведения исследования на АХЭ.

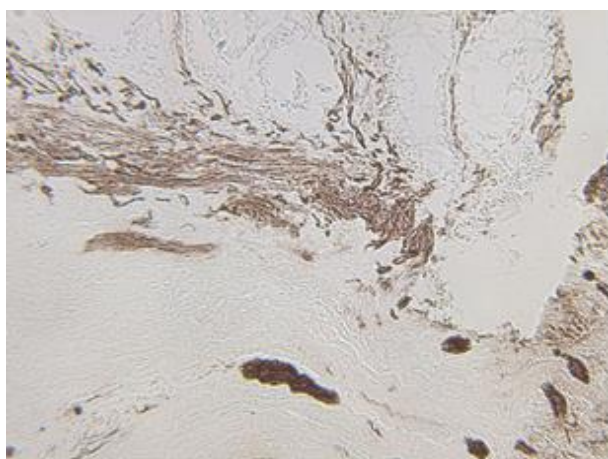


Рис. 1. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 1 год и 3 месяца с БГ. Гистохимическое исследование активности ацетилхолинэстеразы. Ув. x200

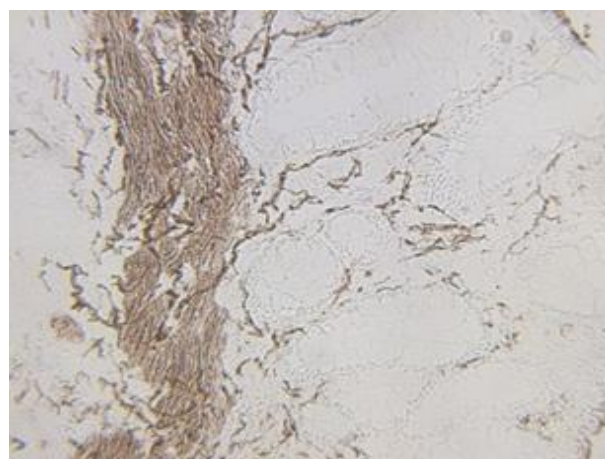


Рис. 2. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 2 месяца с БГ. Гистохимическое исследование активности ацетилхолинэстеразы. Ув. x200

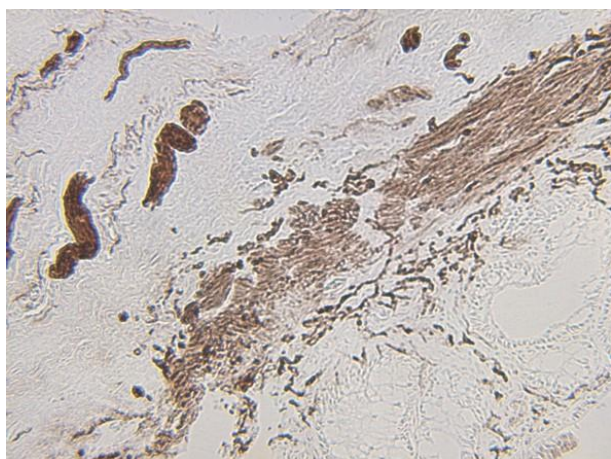


Рис. 3. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 1 месяц с БГ. Гистохимическое исследование активности ацетилхолинэстеразы. Ув. x400

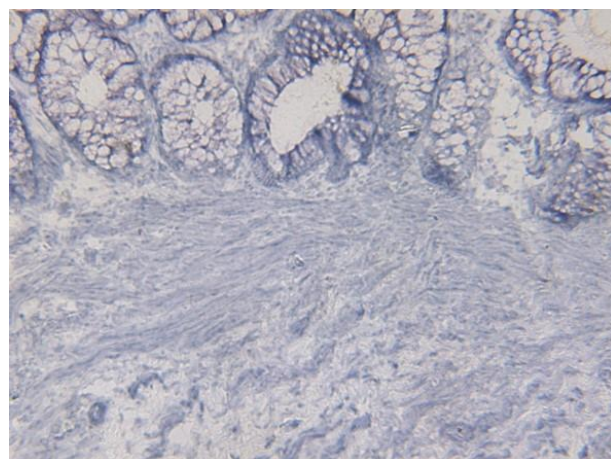


Рис. 4. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 1 месяц с БГ. Гистохимическое исследование активности лактатдегидрогеназы. Ув. x400

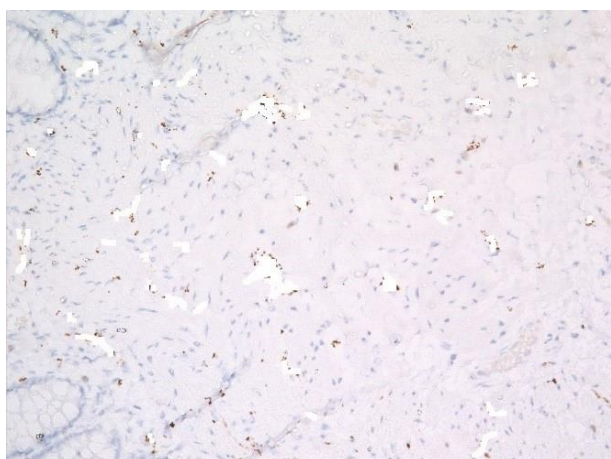


Рис. 5. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 9 месяцев с БГ. Иммуногистохимическая реакция на кальретицин. Ув. x125

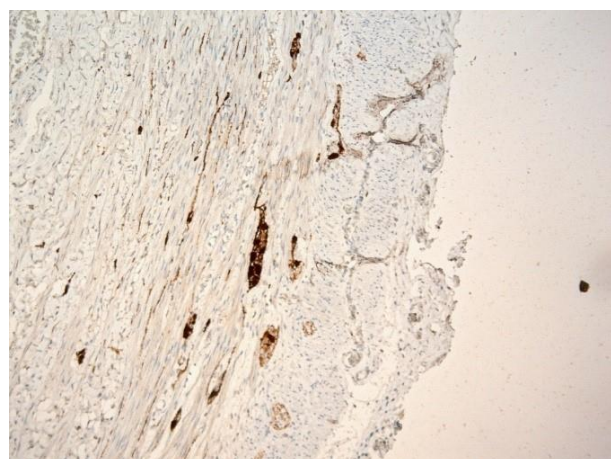


Рис. 6. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 13 месяцев с БГ. Иммуногистохимическая реакция на кальретицин. Ув.: x125

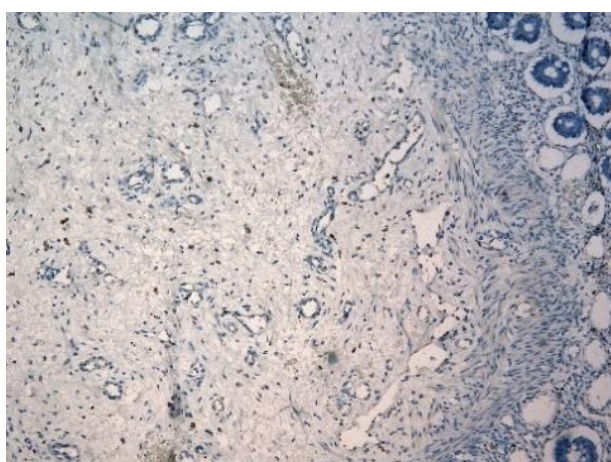


Рис. 7. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 9 месяцев с БГ. Иммуногистохимическая реакция на кальретицин. Ув.: x125

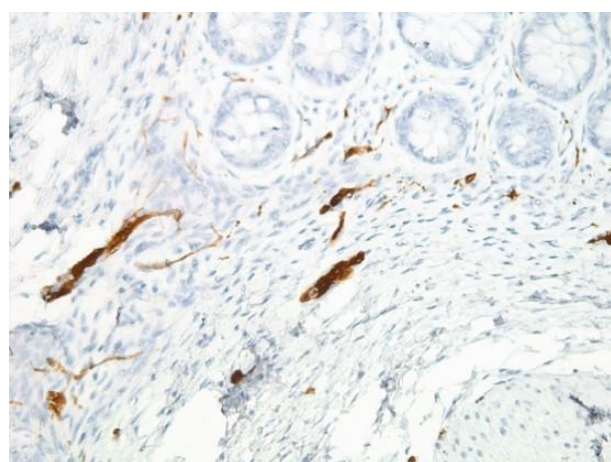


Рис. 8. Микрофото препарата слизистой оболочки прямой кишки пациента возраста 9 месяцев с БГ. Иммуногистохимическая реакция на кальретицин. Ув.: x150

В указанных выше случаях гипертрофии нервных волокон не было выявлено ни в собственной пластике, ни в мышечной пластинке слизистой оболочки прямой кишки, были выявлены лишь немногочисленные небольших размеров нервные ганглии, и, таким образом, диагноз БГ был исключен. Анализ собственных наблюдений позволяет сделать вывод, что не обнаруживается существенной разницы в качестве диагностики БГ при ректальных биопсиях при использовании гистохимических и иммуногистохимических методов в ее классических случаях у пациентов старше 3 лет.

Гистохимический метод позволяет достаточно быстро получить результат при диагностике БГ. Иммуногистохимический метод при ректальных биопсиях требует более глубокого забора материала, что технически ограничивает его использование у новорожденных пациентов, оно дольше по времени, не подходит для ультракоротких форм БГ, однако при исследовании материала резецированной кишки этот метод позволяет выявить различные нарушения иннервации кишки и не только при БГ. Нами был произведен пересмотр гистологического материала в 3 случаях из областных клиник, с помощью иммуногистохимической реакции на исследуемых участках толстой кишки аганглиоз был исключен.

Нами было также произведено морфологическое определение необходимого уровня резекции толстой кишки при хирургическом лечении БГ методом интраоперационной биопсии. С 2016 года 57 пациентам, прооперированным по поводу БГ, выполнялась интраоперационная экспресс-биопсия для определения зоны резекции кишки. У 2 пациентов с протяженной зоной аганглиоза в предполагаемом ганглионарном участке кишки в исследуемом биопсийном материале имелась гистологическая картина с плохо развитыми немногочисленными ганглиями соответствующая переходной зоне, что определило удлинение участка резекции толстой кишки (рис. 9 и рис. 10.)

Было выявлено 3 случая неверно определенной зоны аганглиоза с оставленными аганглионарным (2 случая) и пе-

реходным (1 случай) участками кишки у пациентов, радикально прооперированных в период до применения интраоперационной экспресс-диагностики. Во всех 3 случаях потребовалось повторное хирургическое вмешательство. Таким образом, при выполнении радикального оперативного вмешательства при БГ необходима интраоперационная экспресс-биопсия для определения уровня наложения колоанального анастомоза во избежание ошибок при определении аганглионарного участка и переходной зоны кишки.

Световая микроскопия полнослойных срезов толстой кишки с фиксацией в растворе формалина и методом с окраской препарата гематоксилином и эозином проведена всем пациентам (119 пациентов), оперированным по поводу БГ, как радикально, так и прооперированным по экстренным показаниям с диагнозами кишечной непроходимости или перфорации кишки, которым была выведена стома (рис. 11, рис. 12). В дистальных отделах резецированной кишки обнаружено полное отсутствие нервных ганглиев, как в подслизистой, так и в мышечной оболочке, что подтверждало у пациента диагноз БГ. Наличие нервных ганглиев в проксимальном участке удаленной кишки указывало на полноценно выполненную резекцию кишки. При световой микроскопии был выявлен колит разной степени выраженности у 93% пациентов, в том числе на участке кишки выше зоны аганглиоза. У 25% детей были выявлены другие нарушения иннервации кишки, такие, как малое количество нервных волокон и измененные нервные ганглии и клетки (рис. 13).

Нами также была исследована ультраструктурная организация стенки толстой кишки и определение взаимосвязи между характером электронномикроскопической картины структур стенки толстой кишки при БГ и вероятностью развития послеоперационных осложнений. У 20 пациентов в возрасте от 1 месяца до 16 лет было проведено электронномикроскопическое изучение биоптатов толстой кишки, изъятых во время операции из зоны аганглиоза и проксимальных участков кишки.

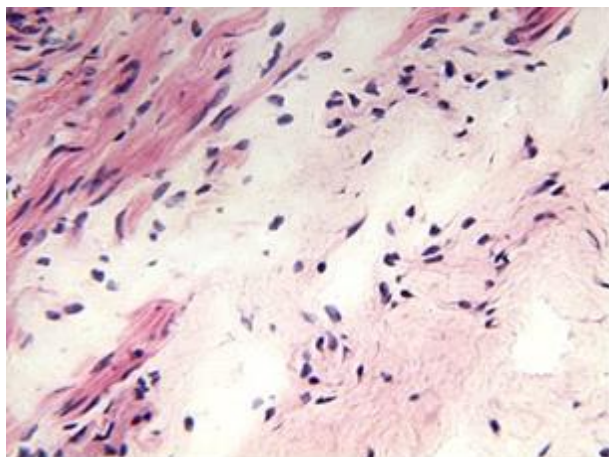


Рис. 9. Микрофото препарата слизистой оболочки интраоперационного экспресс-биоптата прямой кишки в участке аганглиоза пациента возраста 4 месяцев с БГ. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x200

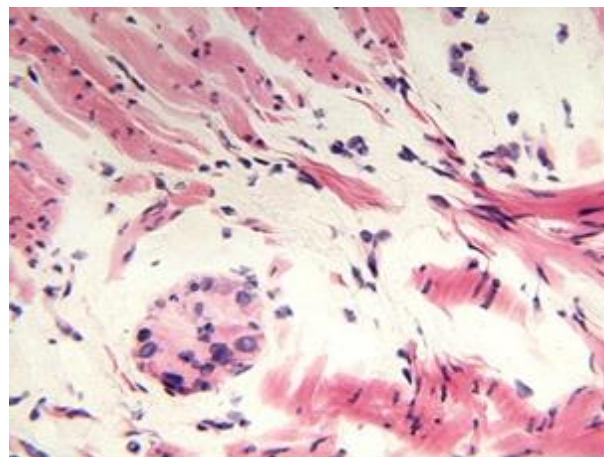


Рис. 10. Микрофото препарата слизистой оболочки интраоперационного экспресс-биоптата прямой кишки в зоне резекции пациента возраста 4 месяцев с БГ. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x200

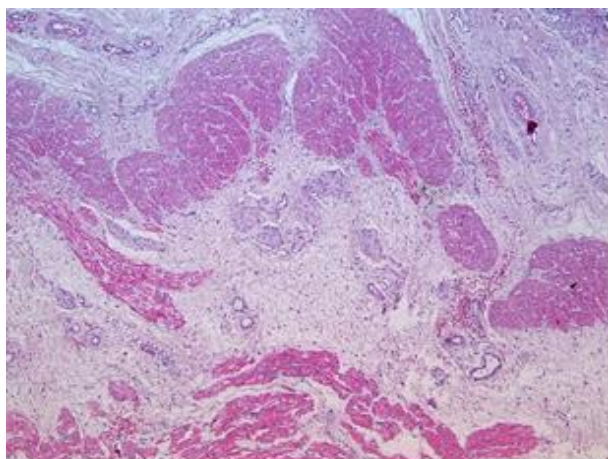


Рис. 11. Микрофото препарата удаленного в ходе операции участка толстой кишки пациента с БГ. Мышечная оболочка. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x125

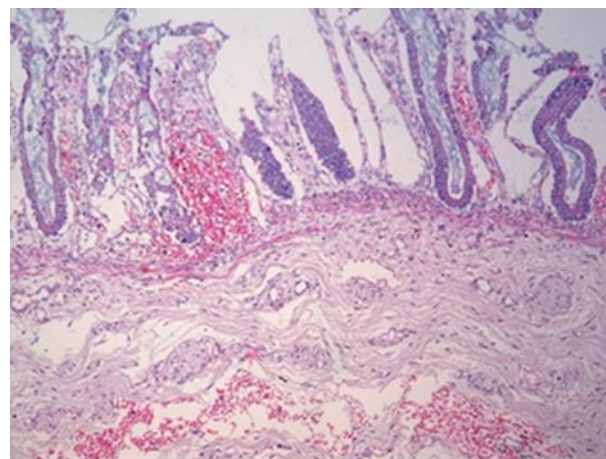


Рис. 12. Микрофото препарата удаленного в ходе операции участка толстой кишки пациента с БГ. Подслизистый слой. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x125

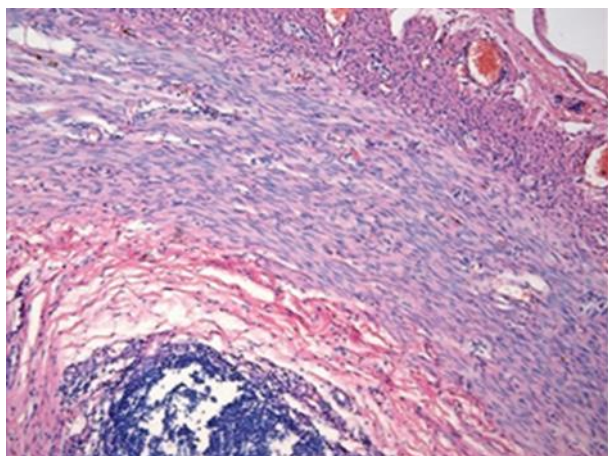
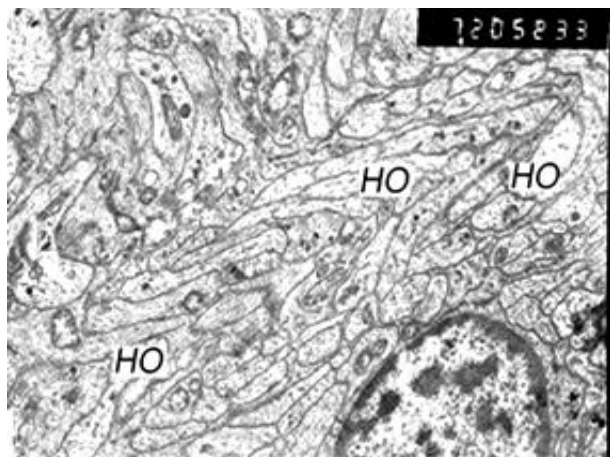


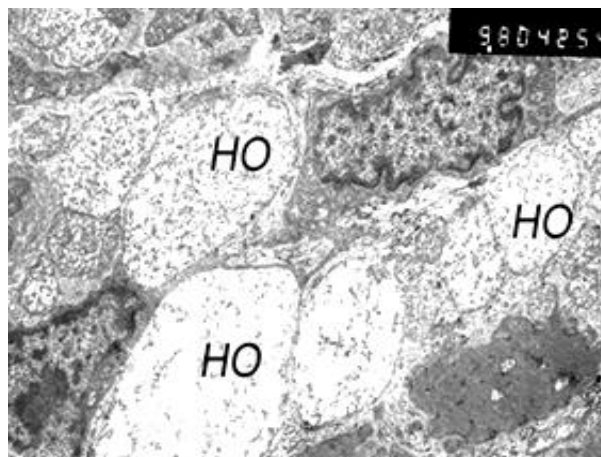
Рис. 13. Микрофото препарата удаленного в ходе операции участка толстой кишки выше зоны аганглиоза пациента с БГ. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: x125

Исследование биоптатов участков толстой кишки пациентов разного возраста показало нарушение организации структур регулирующих систем органа – нервной, иммунной, эндокринной, как в зонах аганглиоза, так и в проксимальных

ее отделах с сохраненной иннервацией. Наблюдалось полное отсутствие интрамуральных нейронов в участке аганглиоза (рис. 14). Выявляемость интерстициальных клеток Кахаля в зонах аганглиоза была значительно снижена.

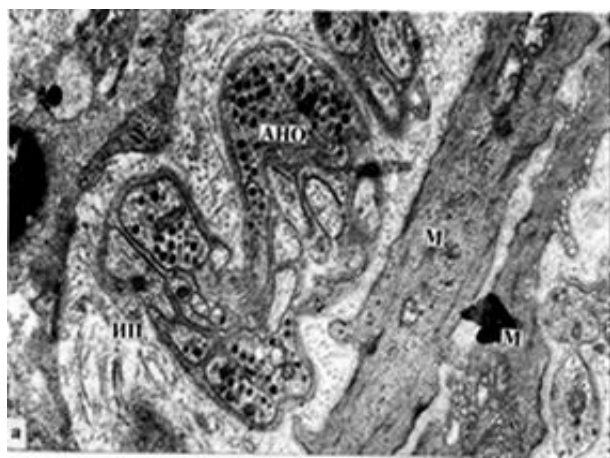


А

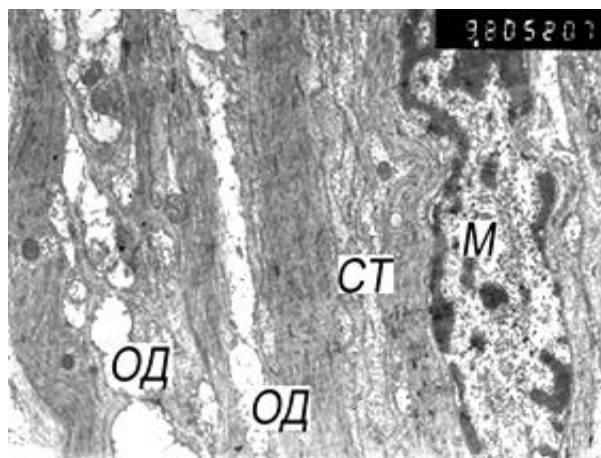


Б

Рис. 14. Электронное микрофото препарата интраоперационного биоптата участка толстой кишки. пациента с БГ. Зона аганглиоза. Обозначения: НО – нервное окончание. А - ув.: x7200, Б - ув.: x9800



А

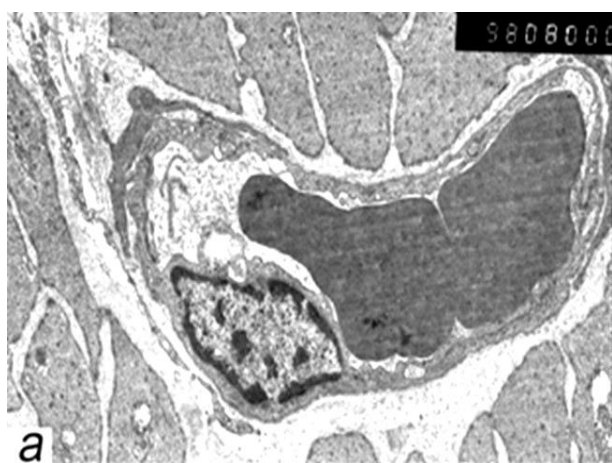


Б

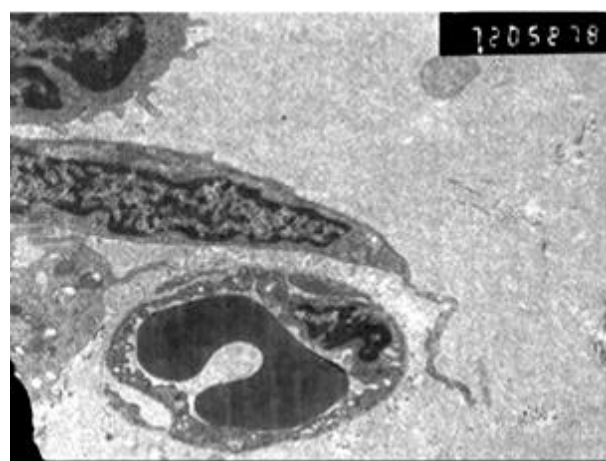
Рис. 15. Электронное микрофото препарата интраоперационного биоптата участка восходящей ободочной кишки пациента с БГ. Ганглионарный участок кишки. Обозначения: АНО – аксонное нервное окончание, М – миоцит мышечной пластинки слизистой оболочки, ИП – интерстициальное пространство, ОД – очаг деструкции, СТ – волокна коллагена. А - ув.: x7200, Б - ув.: x9800

Между пучками мышечных клеток отмечаются разрастания рыхлой волокнистой соединительной ткани, которая постепенно замещает разрушенные миоциты и приводит к фиброзу. В проксимальных участках толстой кишки интраму-

ральные нервные волокна недоразвиты и представлены объемными гипертрофированными образованиями с очагами деструкции среди которых рассеяны нервные окончания, частично или полностью лишенные медиаторных везикул (рис. 15).

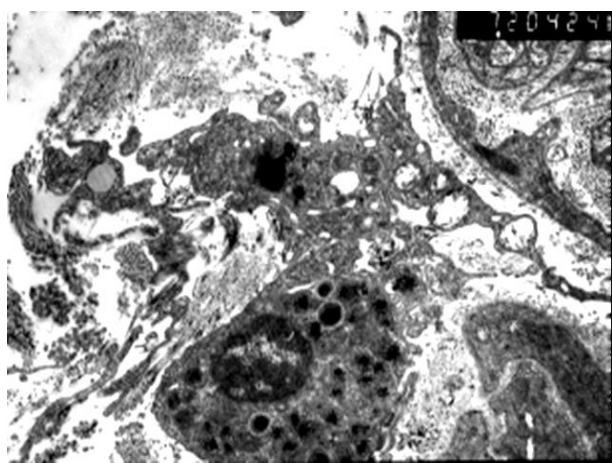


А

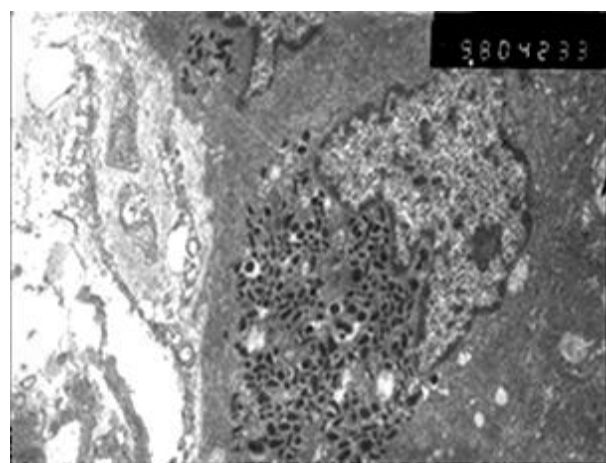


Б

Рис. 16. Электронное микрофото препарата интраоперационного биоптата участка толстой кишки пациента с БГ. Тотальная окклюзия просвета сосудов клетками крови (А) и диапедез эритроцитов в ганглионарной части (Б). Ув.: x9800

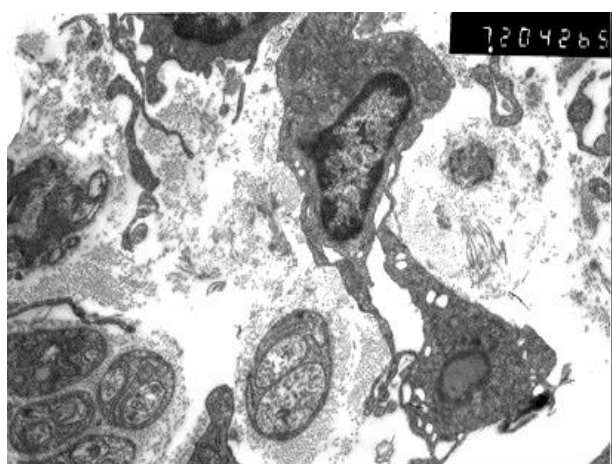


А



Б

Рис. 17. Электронное микрофото препарата интраоперационного биоптата участка толстой кишки пациента с БГ. Ганглионарная зона. Клетки иммунной системы (А) и эндокриноциты (Б) подвергающиеся деструкции. Ув.: x9800



А



Б

Рис. 18. Электронное микрофото препарата интраоперационного биоптата участка толстой кишки пациента с БГ. Ганглионарная зона. Дегенерация интерстициальных клеток Кахаля в мышечном слое стенки толстой кишки пациента 2 месяцев (А); ув.: x7200; пациента 14 лет, ув.: x5800 (Б)

В мышечном слое кишки большая часть внутриклеточных органелл миоцитов подвергается лизису, в результате которого в цитоплазме мышечных клеток формируются объемные фаголизосомы. Отмечается реорганизация ультраструктуры сосудов микроциркуляторного русла участков толстой кишки, расположенных проксимальнее зоны аганглиоза. В результате нарушения проницаемости сосудистой стенки происходит диапедез эритроцитов за пределы кровеносного русла в окружающее межклеточное пространство стенки кишки (рис. 16).

В зоне аганглиоза и участках кишки проксимальнее ее на фоне гипоплазии клеточных структур и уменьшения их количества деструктивным процессам подвергаются клетки иммунной системы (эозинофилы, тучные клетки), характеризующиеся появлением в них многочисленных очагов дегрануляции, что свидетельствует о выходе из клеток биологически активных веществ и утрате ими защитных функций. Аналогичная картина наблюдается и в эндокриноцитах слизистой слоя кишки, в цитоплазме которых формируются гигантские вакуоли и обширные очаги деструкции (рис. 17). Интерстициальные клетки Кахаля выявляются в виде единичных структур с признаками клеточной деструкции (рис. 18).

БГ – одна из важных и сложных проблем в детской хирургии. Гистопатология БГ определяется полным отсутствием интрамуральных нервных клеток и гипертрофией нервных волокон в дистальных участках толстой кишки. Эти патоморфологические критерии хорошо выявляются гистохимическими и иммуногистохимическими тестами для постановки диагноза БГ. На протяжении последних сорока лет анализ реакции тканей и клеток биоптата слизистой оболочки прямой кишки на активность АХЭ имеет существенное практическое значение в подтверждении диагноза БГ, являясь основным методом морфологической диагностики. БГ при гистохимическом исследовании тканей толстой кишки характеризуется, во-первых, увеличением числа парасимпатических нервных волокон в собственной пластинке слизистой оболочки

и, во-вторых, отсутствием нервных клеток в подслизистом и мышечном сплетениях (ганглионарные клетки при этом визуализируются реакцией на активность ЛДГ).

Параллельное использование реакции на активность фермента ЛДГ позволяет подтвердить или исключить аганглиоз в подслизистом сплетении, так как нервные клетки избирательно окрашиваются реакцией на активность ЛДГ. Без использования гистохимической реакции на ЛДГ появляется риск ложноположительного или ложноотрицательного результата постановки диагноза. Использование реакции на активность ЛДГ с визуализацией нервных клеток в подслизистом и мышечном сплетениях дает возможность обнаружения также и других нарушений иннервации кишки.

Ткани ректальных биоптатов при тотальных формах БГ имеют такие же гистохимические признаки, как и при других формах БГ, однако низкая плотность парасимпатических нервных волокон в мышечной и собственной пластинках слизистой оболочки может означать тотальный аганглиоз. Тотальный аганглиоз всегда сопровождается умеренным снижением экстрамуральной парасимпатической иннервации. При тотальном аганглиозе морфометрическими методами было доказано большее снижение плотности нервных волокон к дистальному концу толстой кишки по сравнению с классической формой БГ, плотность нервных волокон резко снижается к ее селезеночному углу. Этим объясняется многообразие клинической картины при аганглиозе. Слизистая оболочка поперечно-ободочной или восходящей кишок не содержит АХЭ-позитивных структур. По биоптатам, полученным из поперечно-ободочной кишки, диагноз может быть поставлен по присутствию или отсутствию нервных клеток в подслизистом или мышечном сплетениях, окрашенных на активность ЛДГ. Таким образом, диагноз БГ при окраске тканей биоптатов на активность АХЭ может быть поставлен только в случае их получения при резекциях ректосигмоидного отдела толстой кишки. В биоптатах, полученных из области стомы или поперечно-ободочной кишки при то-

тальном аганглиозе аналогичные морфологические признаки будут отсутствовать.

Несмотря на высокую чувствительность гистохимического исследования на активность АХЭ имелись случаи как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов. Причиной ошибок возможно были нарушения техники забора биопсийного материала и правил его транспортировки, пропитывание биоптата кровью, незрелость ферментной системы пациента и другие причины. 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. Также ганглионарные клетки иногда трудно отличить от эндотелиальных и других клеток подслизистой. Другой важный фактор указанных не постоянных результатов – соблюдение правил криофиксации при гистохимических исследованиях. Поэтому для диагностики БГ в настоящее время используются также и альтернативные методы.

Иммуногистохимия является современным эффективным методом, который характеризуется простотой забора материала, его транспортировки и фиксации. В настоящем исследовании использовали иммуногистохимическую реакцию на кальретинин – кальций-связывающий белок нервных клеток. Отсутствие окраски на кальретинин в нервных отростках указывает на его отсутствие в соответствующих нервных клетках, что можно использовать как диагностический тест в диагностике аганглионарного сегмента толстой кишки. Важным преимуществом иммуногистохимического исследования является то, что оно позволяет обнаружить различные нарушения иннервации, поскольку выявляет все имеющиеся клетки, в том числе незрелые и небольших размеров. Электронно-микроскопическое исследование в сочетании с гистохимическими и иммуногистохимическими реакциями выявляет ультраструктурные изменения, характерные для БГ, которые также имеют важное значение не только для изучения

патогенеза, но и для разработки способов лечения этого сложного заболевания.

Заключение. Болезнь Гиршпрунга – сложное хирургическое заболевание, верификация которого возможна только гистологическими методами. Разные формы заболевания требуют разных подходов как в диагностике, так и в дальнейшем хирургическом лечении. Только индивидуальный подбор и использование различных методов может способствовать его успешной диагностике у детей. Морфологическое исследование биоптатов толстой кишки свидетельствует о наличии дегенеративных процессов во всех слоях стенки толстой кишки, на развитие которых влияет не только полное отсутствие интрамуральных нейронов в зоне аганглиоза, но и гипоплазия интрамуральных нервных волокон и сплетений на всех участках кишки при этой патологии. Ультраструктурные изменения в стенке толстой кишки проксимальнее зоны аганглиоза свидетельствуют как о первичной гипоплазии структур нервной, эндокринной и иммунной систем в ее стенке, так и вторичных дегенеративных изменениях, развивающихся у пациентов с возрастом. Чем более выражена гипоплазия структур и дегенеративные процессы в стенке ганглионарного участка толстой кишки, тем более существенны нарушения ее функции. Выявленные нами изменения в стенке ганглионарной части толстого кишечника при болезни Гиршпрунга не всегда могут объяснить различные функциональные результаты, связанные с моторикой кишечника, даже после успешного хирургического лечения. Эти изменения также объясняют возникновение у пациентов энтероколитов как в до-, так и в послеоперационном периоде. Нарушения в иммунной системе являются причиной возникновения рецидивирующих энтероколитов. Анализ результатов исследования позволяет утверждать, что для каждой формы болезни Гиршпрунга и вида диагностических биопсий необходимы различные соответствующие методы морфологического исследования. Сложность заболевания требует адекватности методов морфологической диагностики.

Литература

References

1. Tam PK. Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):18-22. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.021>
2. Khazdouz M, Sezavar M, Imani B, et al. Clinical outcome and bowel function after surgical treatment in Hirschsprung's disease. *Afr J Paediatr Surg*. 2015;12(2):143-147. <https://doi.org/10.4103/0189-6725.160403>
3. Lu C, Hou G, Liu C, et al. Single-stage transanal endorectal pull-through procedure for correction of Hirschsprung disease in neonates and nonneonates: A multicenter study. *J Pediatr Surg*. 2017;52(7):1102-1107. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.01.061>
4. Kume Y, Tanaka H, Asano Y, et al. Near-fatal enterocolitis as an opportunity for diagnosing Hirschsprung disease. *J Pediatr Int*. 2020;62(4):504-506. <https://doi.org/10.1111/ped.14114>
5. Langer JC, Rollins MD, Levitt M, et al. Guidelines for the management of postoperative obstructive symptoms in children with Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int*. 2017;33(5):523-526. <https://doi.org/10.1007/s00383-017-4066-7>
6. Hwang S, Kapur RP. Advances and Pitfalls in the Diagnosis of Hirschsprung Disease. *Surg Pathol Clin*. 2020;13(4):567-579. <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.07.001>
7. Serafini S, Santos MM, Tannuri ACA, et al. A new systematization of histological analysis for the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023;17:78:100-198. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2023.100198>
8. Holschneider AM, Puri P. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. 3rd ed. - New York: Springer, 2008. - 414pp
9. Kapur RP, Raess PW, Hwang S, Winter C. Choline Transporter Immunohistochemistry: An Effective Substitute for Acetylcholinesterase Histochemistry to Diagnose Hirschsprung Disease With Formalin-fixed Paraffin-embedded Rectal Biopsies. *Pediatr Dev Pathol*. 2017;20(4):308-320. <https://doi.org/10.1177/1093526617697060>
10. Muise ED, Cowles RA. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a review of techniques, pathology, and complications. *World J Pediatr*. 2016;12(2):135-141. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0068-5>
11. Jeong H, Jung HR, Hwang I, et al. Diagnostic Accuracy of Combined Acetylcholinesterase Histochemistry and Calretinin Immunohistochemistry of Rectal Biopsy Specimens in Hirschsprung's Disease. *Int J Surg Pathol*. 2018;26(6):507-513. <https://doi.org/10.1177/1066896918761235>
12. Olivos M, Correa C, De la Torre L. Current practice of rectal biopsies for the diagnosis of Hirschsprung's disease in Latin America: an international online survey. *Pediatr Surg Int*. 2021;37(4):479-483. <https://doi.org/10.1007/s00383-020-04833-7>
13. Green N, Smith CA, Bradford MC, et al. Rectal suction biopsy versus incisional rectal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int*. 2022;38(12):1989-1996. <https://doi.org/10.1007/s00383-022-05246-4>
14. Righini-Grunder F, Soglio DBD, Hart L, et al. Characterization of the Transition Zone in Short Segment Hirschsprung Disease Using Calretinin Immunostaining. *Pediatr Dev Pathol*. 2022;25(3):270-277. <https://doi.org/10.1177/10935266211053973>
15. Muller CO, Hobeika C, Montalva L, et al. Calretinin Variant in Hirschsprung Disease: Pretransitional Sign and Surgical Planning. *Eur J Pediatr Surg*. 2016;26(5):449-453. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1566106>
16. Yoshimaru K, Yanagi Y, Obata S, et al. Acetylcholinesterase staining for the pathological diagnosis of Hirschsprung's disease. *Surg Today*. 2021;51(2):181-186. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02055-x>
17. Kapur RP, Arnold MA, Conces MR. Infra-anastomotic Innervation of Residual Aganglionic Distal Rectum After Pull-through Surgery for Hirschsprung Disease. *Pediatr Dev Pathol*. 2019;22(5):420-430. <https://doi.org/10.1177/1093526619837788>
18. El-Badawi A, Schenk EA. Histochemical methods for separate, consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in cryostat sections. *J Histochem Cytochem*. 1967;15(10):580-588. <https://doi.org/10.1177/15.10.580>
19. Karnovsky MJ, Roots L. A «direct-coloring» thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem*. 1964;12:219-221. <https://doi.org/10.1177/12.3.219>
20. Bogolepov NN. *Metody elektronno-mikroskopicheskogo issledovaniya mozga*. Moskva: Izdaniye Instituta mozga AMN SSSR, 1976. - 72s

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Говорукина Ольга Алексеевна, доцент, кандидат медицинских наук, заведующая хирургическим отделением № 2, Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск, Республика Беларусь; e-mail: govorukhina@mail.ru

Прокопья Наталья Сергеевна, детский хирург, Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск, Республика Беларусь; e-mail: 6666917@gmail.com

Харитончик Василий Александрович, детский хирург, Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск, Республика Беларусь; e-mail: harivas@mail.ru

Новаковская Светлана Алексеевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь; e-mail: novakovskaya@tut.by

Кузнецова Татьяна Евгеньевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь; e-mail: tania_k@mail.ru

Клецкий Семен Кивович, доцент, кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, Городское клиническое патолого-анатомическое бюро, Минск, Республика Беларусь; e-mail: s.kletski@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Ol'ga A. Govorukhina, Docent, Candidate of Medical Sciences, Head of 2nd Surgical Department of the Republic Scientific and Practical Center for Children's Surgery, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: govorukhina@mail.ru

Natal'ya S. Prokopenya, Pediatric Surgeon, Republic Scientific and Practical Center for Children's Surgery, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: 6666917@gmail.com

Vasily A. Kharitonchik, Pediatric Surgeon of the Republic Scientific and Practical Center for Children's Surgery, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: harivas@mail.ru

Svetlana A. Novakovskaya, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus Republic, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: novakovskaya@tut.by

Kuznetsova T. Evgenievna, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus Republic, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: tania_k@mail.ru

Semyon K. Kletsy, Docent, Candidate of Medical Sciences, Pathologist, City Clinical Pathology Bureau, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: s.kletski@mail.ru