

# Современная морфологическая оценка пищевода Барретта и рака пищевода

Т. В. АХМЕТОВ, С. В. ПЕТРОВ, М. В. БУРМИСТРОВ, Е. И. СИГАЛ,  
А. И. ИВАНОВ, В. Ю. МУРАВЬЕВ

Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, г. Казань

Казанский государственный медицинский университет

Приволжский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, г. Казань

**Актуальность.** Увеличение заболеваемости злокачественными опухолями пищевода, а также неблагоприятный прогноз при этой патологии требует поиска точных методов ранней диагностики предраковых и фоновых состояний, позволяющих определять врачебную тактику и имеющих прогностическое значение.

Пятилетняя выживаемость при раке пищевода составляет лишь 10% (результаты скрининга населения EURO CARE-2 в Европе) и не зависит от гистологического типа опухоли и степени ее дифференцировки. Низкий уровень пятилетней выживаемости отчасти связан с поздней диагностикой рака пищевода. По данным Е. М. Аксель (2006 г.), в 1996, 2000 и 2004 годах в России подавляющее большинство случаев рака пищевода (71,6%, 73,3% и 70,0% соответственно) диагностировалось в III-IV стадиях заболевания [1].

Наиболее частой опухолью пищевода до недавнего времени являлся плоскоклеточный рак (до 90-95% злокачественных новообразований) [3]. В России, США, странах Западной Европы, а также в ряде стран Азии в течение последних нескольких десятилетий отмечается значительный подъем заболеваемости аденокарциномой пищевода [6, 13, 15].

Как показано в большом количестве работ, аденокарцинома пищевода развивается из очагов железистого эпителия, замещающих нормальный многослойный плоский эпителий пищевода при тяжелом гастроэзофагеальном рефлюксе — состоянии впервые описанным английским хирургом Норманом Руппертом Барреттом в 1950 г. и в дальнейшем получившем его имя («пищевод Барретта») [5].

В связи со значительными колебаниями протяженности очагов железистого эпителия, сложностью эндоскопического определения границы между пищеводом и желудком, а также наличием различных гистологических вариантов железистого эпителия, определение понятия «пищевод Барретта» (ПБ) до сих вызывает дискуссии. В патологических очагах может обнаруживаться эпителий по гистологическому строению соответствующий желудочному фундальному (секретирующему), желудочному переходному (не секреторному пищеварительных соков, но обладающему устойчивостью к кислотам) и кишечному (характеризующемуся наличием бокаловидных клеток) эпителию [12]. Американская Академия гастроэнтерологии дает следующее определение ПБ: эндоскопически определяемое изменение эпителия слизистой оболочки пищевода любой протяженности, имеющее гистологическое строение, соответствующее кишечной метаплазии [16]. Европейский консенсус гастроэнтерологов (6-й конгресс OESO, 2003) дает несколько более широкое определение: пищевод Барретта — поражение пищевода, при котором происходит замещение нормального плоского эпителия железистым эпителием на участке любой протяженности, располагающемся выше гастроэзофагеального соединения, которое может быть выявлено макроскопически и подтверждено при помощи гистологического исследования [14]. В настоящее время для обозначения всех видов железистого эпителия, развивающихся в слизистой оболочке пищевода, многими американскими авторами вместо «пищевода Барретта» предлагается использовать понятие «пищевод, выстланный цилиндрическим эпителием». В своем ис-

следовании мы использовали термин «пищевод Барретта» в том же значении, что и сам Норманн Рупперт Барретт, подразумевая пищевод, выстланный цилиндрическим эпителием.

Единого мнения в отношении лечебной тактики при пищеводном Барретта на данный момент не выработано. Однако необходимо отметить тенденцию к смене радикального подхода (резекция пищевода при обнаружении дисплазии любой степени тяжести в ПБ) консервативным (противорефлюксная терапия, применение эндоскопического вмешательства при дисплазии в ПБ) [8, 9].

Несмотря на значительное количество публикаций за последние 20 лет, вопрос о происхождении цилиндрического эпителия в пищеводе Барретта до сих пор не решен. Обсуждаются следующие механизмы: 1) замещение плоского эпителия пищевода растущим вверх желудочным кардиальным [7]; 2) разрастание и трансформация собственных желез пищевода [10]; 3) дифференцировка базальных клеток плоского эпителия в цилиндрический эпителий при определенных условиях [11].

До сих пор не разработаны критерии иммуногистохимической (ИГХ) и гистохимической диагностики ПБ для применения в повседневной практике. Остаются актуальными исследования молекулярных характеристик цилиндрического эпителия ПБ, достоверно указывающих на риск развития аденокарциномы, а также поиск рационального протокола терапии в зависимости от типа метаплазии.

Нами было проведено собственное исследование, целью которого было изучение морфогенеза метаплазий, дисплазий и аденокарцином в пищеводе Барретта. Для достижения этой цели решались следующие задачи: 1) изучить иммуногистохимический фенотип нормального эпителия пищевода у взрослых лиц разного возраста и у плодов; 2) провести анализ изменений в эпителии пищевода при различных формах метаплазий; 3) исследовать диспластические процессы в пищеводе Барретта; 4) изучить иммуногистохимический фенотип аденокарцином, возникающих из пищевода Барретта; 5) создать оптимальный алгоритм иммуногистохимической диагностики для повседневного морфологического исследования пищевода Барретта в онкологической практике.

**Материал и методы исследования.** В соответствии с поставленными целью и задачами исследования за период с 2001 по 2007 гг. было проведено проспективное гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое изучение материала от 87 больных с эндоскопически выявленной патологией пищевода (в Клиническом онкологическом диспансере МЗ РТ), в том числе 67 случаев с подозрением на пищевод Барретта и 20 злокачественных новообразований нижней трети пищевода. Контрольная группа включала аутопсийный материал нормального пищевода взрослых лиц (4 случая) и плодов (6 случаев).

Эндоскопическое исследование пораженного пищевода включало в себя определение границы между пищеводом и желудком (Z-линии). При подозрении на пищевод Барретта или злокачественное новообразование пищевода производилась биопсия только из подозрительных очагов в нижней трети пищевода, расположенных проксимальнее Z-линии и отделенных от желуд-

ка полосой нормального плоского эпителия шириной не менее 1,5 см. Для облегчения визуализации очагов кишечной метаплазии применялась хромоэндоскопия с использованием метиленовой сини.

**Материалом для исследования** служили парафиновые блоки биопсийного, аутопсийного и операционного материалов. Для гистологического исследования использовались парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. Для выявления веществ мукополисахаридной природы применялись методы гистохимического окрашивания Шифф-йодной кислотой (ШИК) по Мак-Манусу, альциановым синим по Стивдену, толуидиновым синим, комбинированное окрашивание альциановым синим и ШИК (по Моури). При исследовании кишечной метаплазии в ПБ оценивался клеточный состав и гистохимические свойства с использованием аналогичных критериев для кишечной метаплазии в желудке, предложенных отечественными и зарубежными авторами (Аруин Л. И., 1998, Vo-utilainen M., 1999) [2, 17].

Проводилось иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием моно- и поликлональных первичных антител к белкам промежуточных филаментов эпителиальных клеток (цитокератинам — ЦКР № 7, № 20, ЦКР высокого молекулярного веса, ЦКР-PAN), клеток мезенхимального происхождения (виментину), маркера дисплазии (p53, циклину D1) и пролиферации (Ki-67), а также ряду других тканеспецифических белков (эпителиальному мембранному антигену, раковому эмбриональному антигену, виллину, лизоциму, CD68, миелопероксидазе, коллагену IV). В иммуногистохимических реакциях использовалась система визуализации стрептавидин-биотин (LSAB), DAKO [4].

Подсчет индекса пролиферации (по метке Ki-67) выполняли с помощью системы для морфометрии на базе микроскопа Leica CTR 5000IBM PC и персонального компьютера Pentium 4 и пакета программ «Leica Qwin 3000». При исследовании ПБ подсчет индекса пролиферации проводился отдельно в глубоких и поверхностных отделах метапластических желез.

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программы «Microsoft Excel» пакета «Microsoft Office 2003» с определением доверительного интервала для средней (по Р. Фишеру) и величины р (достоверность различий между изучаемыми группами). Степень достоверности различий показателей пролиферации между исследованными группами наблюдений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при 95% уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

**Результаты собственных исследований.** У плодов на сроке 14-16 недель гестации эпителиальная выстилка пищевода и была представлена многослойным кубическим эпителием со светлыми вакуолями (соответствующим переходному эпителию взрослых лиц). На сроке 18-20 недель гестации в пищеводе плодов одновременно обнаруживались участки и плоского, и многоядного кубического эпителия. На сроке 20-25 недель гестации выстилка пищевода была представлена преимущественно зрелым многослойным плоским неороговевающим эпителием. Гистохимически, при помощи ШИК-реакции, была выявлена позитивная реакция на гликоген в эпителии пищевода плодов всех исследованных сроков гестации. С увеличением срока гестации интенсивность ШИК-реакции увеличивалась от слабой (12-16 нед.) до яркой (18-20 нед. и более). При помощи иммуногистохимического метода на сроке 12-14 недель гестации в эпителии пищевода плода выявлялась яркая позитивная реакция на ЦКР № 7 и ЦКР-PAN, негативная реакция на ЦКР № 20 и виллин. Реакция на ЦКР высокого молекулярного веса (характерная для нормального эпителия пищевода взрослых лиц) на этом сроке была негативной. На 18-20 неделе гестации в эпителии пищевода плода выявлялась яркая позитивная реакция на ЦКР-PAN, яркая позитивная реакция на ЦКР высокого молекулярного веса и негативная реакция на ЦКР № 7, ЦКР № 20 и виллин. На сроках 20-25 недель гестации реакция на ЦКР высокого молекулярного веса в эпителии пищевода была ярко позитивной; на ЦКР № 20 и виллин — негативной.

Среди 64 случаев гистологически выявленной железистой метаплазии эпителия пищевода взрослых лиц в зависимости от

строения и гистохимических характеристик мы выделили 2 основных варианта: желудочная и кишечная (в т. ч. «полная» и «неполная»). Кроме того, в отдельную группу отнесены случаи кишечной метаплазии на фоне желудочной метаплазии.

Желудочная метаплазия эпителия пищевода была выявлена у 28 больных, возраст которых составлял от 38 до 74 лет (в среднем 52,8 лет); 20 (71,4%) пациентов были мужского и 8 (28,56%) — женского пола. В ПБ при метаплазии желудочного типа гистохимически определялись нейтральные муцины (яркая или умеренная ШИК реакция), гистохимические реакции на кислые и сульфатированные муцины были негативными.

Имуногистохимически желудочная метаплазия характеризовалась яркой позитивной реакцией с антителами к ЦКР № 7, слабой или негативной реакцией с антителами к виллину, слабой апикальной реакцией на РЭА и негативной реакцией на ЦКР №20. В 7 из 28 случаев (25%) желудочной метаплазии была обнаружена позитивная реакция с антителами к цитокератинам высокой молекулярной массы.

При анализе маркера Ki-67 в случаях желудочной метаплазии в поверхностных отделах желез пролиферация была низкой (4,15±0,21%), в глубоких отделах — высокой (55,6±6,2%) (рис. 1).

Кишечная метаплазия была выявлена у 23 пациентов в возрасте от 31 до 61 года (в среднем 52,6 года). 17 лиц были мужского и 6 — женского пола. Метаплазия эпителия пищевода кишечного типа гистологически характеризовалась наличием в железах бокаловидных и цилиндрических клеток.

**Рисунок 1. Метаплазия эпителия пищевода желудочного типа высокий уровень пролиферации в глубоких отделах желез (индекс пролиферации по метке Ki-67 68%), 400x. LSAB-метод. Хромоген — DAB**



С помощью гистохимического и иммуногистохимического методов была выделена «полная» (7 случаев) и «неполная» (16 случаев) кишечная метаплазия. При «полной» кишечной метаплазии отмечалось окрашивание секрета бокаловидных клеток на нейтральные (ШИК-реакция по Мак-Манусу) и кислые (альциановым синим по Стивдену, рН 2,5) муцины, негативная гистохимическая реакция на сульфомуцины (окраска толуидиновым синим, рН 1,0). Цилиндрические клетки, лежащие между бокаловидными клетками не окрашивались гистохимическими методами на муцины. При «неполной» кишечной метаплазии секрет бокаловидных клеток включал не только нейтральные и кислые, но и сульфатированные муцины. При этом виде метаплазии в цилиндрических клетках, лежащих между бокаловидными клетками гистохимически выявлялись кислые муцины (окрашивание альциановым синим по Стивдену, рН 2,5).

Имуногистохимически «неполная» кишечная метаплазия характеризовалась яркой умеренной очаговой реакцией на ЦКР № 7, очаговой неравномерной реакцией на ЦКР № 20, яркой позитивной реакцией на виллин (апикально) и РЭА (цитоплазматически и апикально). Фенотип «полной» кишечной метаплазии по данным, иммуногистохимического анализа включал в себя



экспрессию ЦКР № 7 в поверхностном и глубоком слоях железистого эпителия, яркую положительную реакцию на ЦКР №20 в поверхностных отделах желез и позитивную апикальную реакцию на виллин, апикальную реакцию на РЭА (рис. 2).

В 6 случаях из 23 (26,1%) кишечной метаплазии была обнаружена позитивная реакция (от умеренной до яркой) с антителами к цитокератинам высокой молекулярной массы.

При кишечной метаплазии уровень пролиферации в поверхностных отделах желез был достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем при метаплазии желудочного типа, и составлял в среднем  $8,45 \pm 0,33\%$ . Средний уровень пролиферации в глубоких отделах желез был высоким ( $62 \pm 5,8\%$ ), разница с метаплазией желудочного типа статистически недостоверна ( $p > 0,05$ ).

Желудочная метаплазия с очагами кишечной метаплазии была выявлена в 13 случаях, у 10 мужчин и 3 женщин в возрасте от 48 до 74 лет (средний возраст 59,6 лет). Гистологически эта патология пищевода характеризовалась наличием единичных желез, содержащих бокаловидные клетки среди преобладающих по количеству желез желудочного типа (без бокаловидных клеток).

Гистохимически в метапластических железах желудочного типа выявлялись нейтральные муцины при отсутствии в них кислых и сульфатированных муцинов.

Участки кишечного строения по гистохимическим свойствам были отнесены к «неполной» кишечной метаплазии: отмечалось накопление кислых, нейтральных и сульфатированных муцинов в бокаловидных клетках, а также положительная реакция на кислые муцины в цилиндрических клетках.

Иммуногистохимический фенотип очагов кишечного строения (на фоне желудочной метаплазии) соответствовал полной или неполной кишечной метаплазии и отличался от окружающих желез желудочного типа. Железы желудочного типа характеризовались яркой реакцией на ЦКР № 7, слабой апикальной реакцией на виллин в части желез и негативной реакцией на ЦКР № 20 и РЭА. В очагах кишечного типа отмечалась умеренная очаговая реакция на ЦКР № 20 (неполная кишечная метаплазия), яркая апикальная реакция на виллин и яркая цитоплазматическая реакция на РЭА. В 4 случаях (из 13) кишечной метаплазии на фоне желудочной метаплазии была обнаружена слабая позитивная реакция на цитокератины высокой молекулярной массы.

Уровень пролиферации по количеству Ki-67 позитивных ядер в метапластических железах кишечного типа составил в среднем  $5,8 \pm 1,3\%$  в поверхностных отделах желез и  $55,6 \pm 6,2\%$  в глубоких отделах желез. Различия уровня пролиферации в очагах кишечной метаплазии на фоне желудочной метаплазии и «чисто» кишечной и «чисто» желудочной метаплазиями статистически недостоверны ( $p_1, 2 > 0,05$ ).

Признаки дисплазии были выявлены лишь в 3 из 23 (13,0%) случаях кишечной метаплазии и 2 из 13 (15,3%) случаях кишечной метаплазии на фоне желудочной метаплазии. При иммуногистохимическом анализе с использованием антител к маркеру p53 позитивная реакция была выявлена в 2-х случаях кишечной метаплазии (8,7% всех случаев и 66,7% дисплазий при кишечной метаплазии), а также 1-ом случае кишечной метаплазии на фоне желудочной метаплазии (7,7% всех случаев и 50% дисплазий при данном виде метаплазии). Экспрессии циклина D1 и HER2/neu в случаях подозрения на дисплазию не обнаружено. В случае дисплазии в поверхностных отделах желез уровень пролиферации был достоверно выше ( $19,5 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 3), чем в метаплазии кишечного и желудочного типов без признаков дисплазии. Уровень пролиферации в глубоких отделах желез составил  $66,3 \pm 4,8\%$ , разница между уровнем пролиферации в глубоких отделах желез при дисплазии на фоне кишечной метаплазии, кишечной и желудочной метаплазии без дисплазии статистически недостоверна ( $p > 0,05$ ).

Среди исследованных 20 случаев рака пищевода гистологически были выявлены аденокарцинома, низкодифференцированный рак и низкодифференцированный плоскоклеточный рак.

Аденокарцинома пищевода была обнаружена в 11 случаях. Возраст пациентов составлял от 52 до 81 года (в среднем 69,5 лет), 7 пациентов были мужского и 4 — женского пола. Согласно классификации TNM выделены следующие стадии аденокарциномы пищевода: 4 случая (36,4%) T3N0M0, 3 (27,2%) T3N1M0,

4 (36,4%) T4N1M0.

Среди 11 выявленных случаев аденокарциномы пищевода гистологически определялись папиллярный, тубулярный и диффузный типы строения. Инвазия опухоли в прилежащие ткани выявлена во всех исследованных случаях. Гистохимически в атипических железах аденокарцином в 8 наблюдениях выявлены нейтральные муцины (интенсивность ШИК реакции была от слабой до выраженной) и в 6 случаях — кислые муцины. Гистохимическое определение сульфатированных муцинов дало негативный результат.

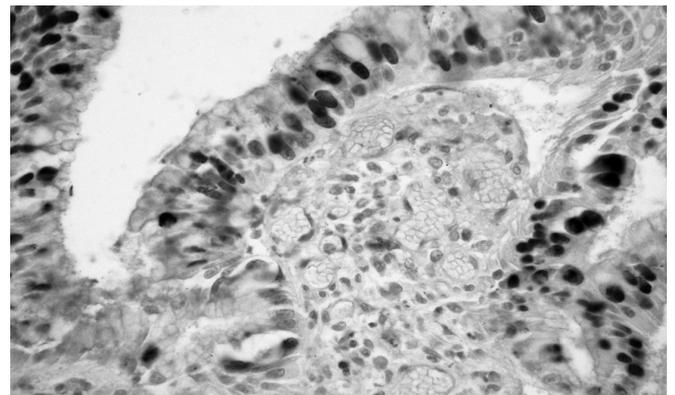
**Рисунок 2. Метаплазия эпителия пищевода кишечного типа: позитивная реакция на виллин (более ярко — апикально), 200x. LSAB-метод. Хромоген — DAB**



По результатам проведенного иммуногистохимического анализа 11 случаев аденокарцином было выявлено 3 варианта фенотипа: 3 случая (27,3%) — «желудочного типа» (экспрессия ЦКР № 7 и виллина, нейтральных муцинов), 3 случая (27,3%) — «смешанного кишечно-желудочного типа» (позитивная реакция на ЦКР № 7 и № 20, виллин, нейтральные и кислые муцины) и 5 случаев (45,4%) — «кишечного типа» (экспрессия ЦКР № 20 и виллина, а также нейтральных и кислых муцинов).

В 7 из 11 (63,4%) случаев аденокарцином при помощи ИГХ анализа нами была выявлена позитивная реакция в опухолевых клетках на цитокератины высокой молекулярной массы (№№ 5, 14), экспрессируемые в норме плоскими и протоковыми эпителиями.

**Рисунок 3. Метаплазия эпителия пищевода кишечного типа с признаками дисплазии: высокий уровень пролиферации в поверхностных отделах желез (индекс пролиферации по метке Ki-67 27,7%), 400x. LSAB-метод. Хромоген — DAB**



В 5 случаях из 11 (45,4%) аденокарцином пищевода выявлена позитивная реакция на онкобелок p53. Уровень пролиферации при аденокарциномах пищевода был высоким и составлял  $44 \pm 3,3\%$ . Разница между уровнем пролиферации в аденокарциномах и всех вариантах ПБ статистически достоверна ( $p < 0,05$ ). Инвазия