

На правах рукописи

МАСЛЁНКИНА КСЕНИЯ СЕРГЕЕВНА

**Морфологическая неоднородность и
иммуногистохимические особенности
пищевода Барретта
и цилиндроклеточной метаплазии пищевода
при оценке потенциала малигнизации**

14.03.02 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Михалева Людмила Михайловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,

Андреева Юлия Юрьевна

профессор кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО РМАНПО)

доктор медицинских наук,

Тертычный Александр Семенович

профессор кафедры патологической анатомии имени А.И. Струкова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет))

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН) Медицинский институт, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Защита состоится «__» _____ 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время во всем мире отмечен рост заболеваемости аденокарциномой пищевода (АКП), который, по статистическим оценкам, будет продолжаться до 2030 года (Arnold M., 2017). Наибольшая распространенность АКП наблюдается в Великобритании, Нидерландах, Ирландии, Исландии и Новой Зеландии (Arnold M., 2015). Ежегодный прирост АКП составляет от 3,5% в Шотландии до 8,1% в штате Гавайи (Federico A., 2007, Labenz J., 2015). В связи с этим в 2018 году рак пищевода в мире занял 7 место по заболеваемости и 6 место по смертности среди всех злокачественных новообразований (Bray F., 2018, Fan J., 2020, Wong M.C.S., 2018). АКП имеет неблагоприятный прогноз: 5-летняя выживаемость пациентов составляет всего 9,2-20% (Гладилина И.А., 2020, American Cancer Society, 2021, Lepage C., 2009, SEER, 2021). В связи с этим особенно актуальна эндоскопическая и патоморфологическая диагностика предопухолевых заболеваний пищевода.

Пищевод Барретта (ПБ) является факультативным предраковым заболеванием дистального отдела пищевода. В 95-97% случаев АКП развивается именно на фоне ПБ (Кармакова Т.А., 2020, Зайратьянц О.В., 2016). Поэтому большое значение приобретает патоморфологическая диагностика ПБ с прицельным вниманием на наличие дисплазии и стратификация риска опухолевой прогрессии у пациентов с ПБ. Своевременная диагностика ПБ, программы эндоскопического наблюдения и канцеропревенции у пациентов с ПБ имеют цель первичной профилактики АКП (Кайбышева В.О., 2020, Кляритская И.Л., 2019, Маев И.В., 2017, Wiethaler M., 2019).

По некоторым оценкам, ПБ встречается у 1,3-2% от общей популяции (Ronkainen J., 2005, Zagari R.M., 2008). ПБ развивается как осложнение у 10-15% пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) (Мастыкова Е.К., 2010, Johansson J., 2005, Shaheen N.J., 2016). В мета-анализе 2020 года распространенность ПБ в мире составила 0,82% от общей популяции и 4,53% пациентов с ГЭРБ (Marques de Sá I., 2020). По данным Василевского Д.И. и соавт. (2018), в Ленинградской области ПБ встречается в 0,83% всех эзофагогастроуденоскопических (ЭГДС) исследований. В республике Хакасия распространенность ПБ составила 1,2%, в

Сибири – 1,5-2,1% (Буторин Н.Н., 2013, Цуканов В.В., 2016, 2018). Оценка истинной распространенности ПБ сложна, т.к. у части пациентов заболевание протекает бессимптомно. Кроме того, сложности в диагностике и оценке заболеваемости связаны с тем, что до сих пор в мире нет единого определения ПБ.

Международный консенсус ВОВ САГ определяет ПБ как любой тип цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода (ЦМДОП) с указанием в гистологическом заключении типа метаплазии (Bennett C., 2015), по рекомендациям Американского общества гастроэнтерологов (Shaheen N.J., 2016) и Российского общества патологоанатомов (Зайратьянц О.В., 2016) для диагностики ПБ необходимо наличие именно кишечной метаплазии (КМ), поскольку КМ является доказанным фактором риска малигнизации.

В настоящее время ведутся дискуссии о том, является ли роль КМ исключительной при канцерогенезе или другие типы ЦМ могут вносить свой вклад в развитие дисплазии и АКП. Эпидемиологические данные указывают на то, что частота опухолевой прогрессии выше у пациентов с КМ (0,38% в год) по сравнению с пациентами с ЦМ (0,07% в год) (Bhat S., 2011). В других исследованиях частота развития АКП у пациентов с КМ и ЦМ статистически не различалась (Gatenby P.A., 2008, Kelty C.J., 2007). Takubo K. et al. (2009) показали, что более чем у 70% пациентов с миниатюрной (менее 20 мм) АКП предшествующим изменением была ЦМДОП. Watanabe G. et al. (2015) выявили, что желудочный фенотип (экспрессия MUC5A и MUC6 при негативной экспрессии маркеров кишечной дифференцировки) чаще обнаруживается при мелких размерах АКП. По данным Lavery D.L. et al. (2016), малигнизация может происходить в ЦМДОП кардиального типа без экспрессии CDX2. В то же время высокая плотность бокаловидных клеток (БК) при КМ может играть защитную роль и снижает риск развития АКП (Kunze B., 2020, Schellnegger R., 2017, Srivastava A., 2015). Вероятно, в ДОП существует два независимых пути канцерогенеза: кишечный и фовеолярный (Demico E.G., 2011, Khor T.S., 2012).

Частота развития АКП у пациентов с ПБ без дисплазии составляет 0,12-0,33% в год (Bhat S., 2011, Desai T.K., 2012, Hvid-Jensen F., 2011). Вероятность развития АКП возрастает с увеличением длительности наблюдения: 0,19% в первые 5 лет с момента установления диагноза ПБ и 0,63% через 20 лет наблюдения (Kroep S.,

2015). У пациентов с дисплазией низкой степени (low-grade dysplasia, LGD) частота развития АКП составляет от 0,76 до 28% в год (**Bhat S., 2011, Duits L.C., 2015, 2017**). А у пациентов с дисплазией высокой степени (high-grade dysplasia, HGD) на фоне ПБ риск малигнизации составляет 2,3-19% случаев в год (**Rastogi A., 2008, Shaheen N.J., 2009**). В исследовании **Montgomery E. et al. (2001)** частота развития АКП у пациентов с HGD составила 60% при медиане наблюдения за пациентами 7 месяцев.

В связи с разным риском прогрессии у пациентов с LGD и HGD на фоне ПБ и ЦМДОП, тактика ведения этих пациентов различна: при LGD показана медикаментозная терапия ингибиторами протонной помпы и выполнение повторной ЭГДС с взятием биопсии, при HGD рекомендовано выполнение радиочастотной абляции слизистой оболочки пищевода (**Аллахвердян А.С., 2015, Кашин С.В., 2009, Bennett C., 2015, Fitzgerald R.C., 2014, Shaheen N.J., 2016**).

Патоморфологическая диагностика дисплазии при ПБ требует опыта и часто вызывает разногласия среди патоморфологов (**Kaye P.V., 2016, Kerkhof M., 2007, Montgomery E., 2001**): при использовании одинаковых диагностических критериев коэффициент согласия в отношении наличия и степени дисплазии остается низким. В связи с этим в мире ведутся исследования по разработке панели иммуногистохимических (ИГХ) маркеров для оптимизации диагностики наличия и определения степени дисплазии.

Степень разработанности темы исследования

Патоморфологическая диагностика дисплазии и дифференциальная диагностика степени дисплазии при ПБ и ЦМДОП представляет важную задачу, поскольку схема эндоскопического наблюдения и лечения пациентов с ПБ и ЦМДОП без дисплазии, с LGD и HGD принципиально разная.

Однако зачастую патоморфологическая диагностика наличия и определение степени дисплазии в материале эзофагогастробиоптатов слизистой оболочки пищевода представляет значительные трудности. Отдельные иммуногистохимические маркеры показали эффективность при диагностике дисплазии, но все они имеют свои ограничения по чувствительности и специфичности. В настоящее время панель иммуногистохимических маркеров, позволяющая оптимизировать диагностику наличия и степени дисплазии, не разработана.

В литературе есть единичные работы, посвященные определению иммунофенотипа дисплазии при ПБ и ЦМДОП. Именно иммунофенотип дисплазии позволяет проследить фовеолярный и кишечный пути канцерогенеза и способствует углубленному изучению патогенеза развития дисплазии при ПБ и ЦМДОП.

Цель исследования

Охарактеризовать морфологические особенности и иммуногистохимический профиль пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода в условиях наличия и отсутствия дисплазии.

Задачи исследования

1. Провести клинко-морфологическое сопоставление и морфометрическое исследование биоптатов с пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода в зависимости от длины сегмента метаплазии.

2. Провести клинко-морфологическое сопоставление и морфометрическое исследование биоптатов с пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода при наличии и отсутствии дисплазии.

3. Определить иммунофенотип при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода при наличии и отсутствии дисплазии с помощью маркеров желудочной (MUC5A и MUC6) и кишечной дифференцировки (MUC 2).

4. Определить значение иммуногистохимического исследования с маркерами p53, p16, Ki67, cyclin D1, β -catenin и AMACR в оценке дисплазии при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода.

5. Разработать алгоритм клинко-морфологического и иммуногистохимического исследования при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода при наличии/отсутствии дисплазии.

Научная новизна

На основании проведенного клинко-морфологического анализа оценена частота встречаемости пищевода Барретта и

цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода при разной длине сегмента метаплазии.

Проведена комплексная морфометрическая оценка содержания бокаловидных клеток при пищеводе Барретта без дисплазии и выявлена корреляционная связь морфометрических параметров с длиной сегмента метаплазии; у пациентов с пищеводом Барретта с наличием дисплазии такая связь не прослеживается.

Дана морфологическая и иммуногистохимическая характеристика low-grade и high-grade дисплазии кишечного и фовеолярного типа при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии пищевода, а также показана связь типа дисплазии с плотностью бокаловидных клеток.

Разработана панель иммуногистохимических маркеров, оптимизирующая диагностику пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода при наличии и отсутствии дисплазии.

Теоретическая и практическая значимость

- Результаты проведенного комплексного клинко-морфологического, морфометрического и иммуногистохимического исследования способствуют расширению представлений о патоморфологии пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода, определению критериев дифференциальной диагностики этих заболеваний и уточнению механизмов развития дисплазии и малигнизации.

- Установлена прямая корреляционная связь между эндоскопическими параметрами, определяющими протяженность сегмента метаплазии, и морфометрическими показателями, характеризующими содержание бокаловидных клеток (общим числом, плотностью бокаловидных клеток и относительным числом крипт, содержащих бокаловидные клетки) в биоптатах дистального отдела пищевода при пищеводе Барретта.

- Установлена диагностическая значимость иммуногистохимических маркеров для диагностики наличия и степени дисплазии при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода: показано, что в ряду пищевод Барретта и цилиндроклеточная метаплазия дистального отдела пищевода без дисплазии – LGD – HGD увеличивается экспрессия маркеров p53,

Ki67, cyclin D1 и AMACR. Экспрессия β -catenin меняется с мембранной при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии пищевода без дисплазии и LGD до цитоплазматической и ядерной при HGD.

- Разработана панель иммуногистохимических маркеров, которая повышает точность диагностики наличия и степени дисплазии при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода, что позволяет стратифицировать риск малигнизации и оптимизировать лечебную тактику с учетом потенциального развития аденокарциномы пищевода.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с пищеводом Барретта без дисплазии с увеличением длины сегмента нарастает общее число и плотность бокаловидных клеток (коэффициент ранговой корреляции Спирмена между общим числом бокаловидных клеток и длиной циркулярного сегмента составил 0,67, а между общим числом бокаловидных клеток и длиной максимального участка метаплазии 0,64, $p < 0,0001$; коэффициент ранговой корреляции Спирмена между плотностью бокаловидных клеток и длиной циркулярного сегмента составил 0,62, а между плотностью бокаловидных клеток и длиной максимального участка метаплазии 0,60, $p < 0,0001$).

2. При пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода реализуются два пути канцерогенеза: кишечный и фовеолярный, что проявляется четко прослеживаемыми морфологическими особенностями дисплазии и наличием двух иммунофенотипов дисплазии. При пищеводе Барретта дисплазия выявляется значительно чаще, чем при цилиндроклеточной метаплазии пищевода желудочного типа (точный критерий Фишера, $p = 0,0007$).

3. Наибольшее значение для диагностики наличия и степени дисплазии при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода имеет иммуногистохимическое исследование с маркерами p53, Ki67 и cyclin D1, экспрессия которых градуально нарастает в ряду: отсутствие дисплазии – low-grade дисплазия – high-grade дисплазия. А для дифференциальной диагностики между low-grade и high-grade дисплазией, помимо

перечисленных маркеров, информативно иммуногистохимическое исследование с β -catenin и AMACR.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы основана на изучении клинко-морфологических и иммуногистохимических особенностей у пациентов с пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода без дисплазии и при наличии low-grade и high-grade дисплазии.

Алгоритм обследования включал в себя применение клинических, эндоскопических, а также комплекса патоморфологических методов исследования, таких как гистологический, гистохимический, морфометрический и иммуногистохимический.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в работу патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы». Разработанная панель иммуногистохимических маркеров применяется для диагностики наличия и степени дисплазии при пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода. Для диагностики пищевода Барретта при неоднозначной морфологической картине используется иммуногистохимическое исследование с MUC2.

Степень достоверности работы

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных методов, достаточным объемом данных для каждой исследуемой группы и количеством групп сравнения, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы.

Материалы и основные положения диссертации были доложены и обсужданы на следующих конференциях: 31st European Congress of Pathology (сентябрь 2019), на образовательном форуме International Educational Endoscopy Video Forum (ноября 2019), 4th Teleconference of Japan-Russia between Pirogov Russian National

Research Medical University and Oita University: Difficult cases in Endoscopy (декабрь 2019), «I Крымском форуме «Онкология, патоморфология и патофизиология: от теории к практике»» (октябрь 2020 г.), на Конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (ноябрь 2020 г.), 32nd Congress of the ESP and XXXIII International Congress of the IAP (декабрь 2020), XII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии им. Н.Н.Трапезникова (апрель 2021), на межлабораторной конференции ФГБНУ НИИ морфологии человека (апрель 2021).

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в сборе литературных данных, их анализе и обобщении, сборе материала, диагностике, анализе, получении данных, проведении морфометрического подсчета содержания бокаловидных клеток, а также полученных иммуногистохимических реакций, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации по теме работы

Результаты исследования изложены в 8 работах, из них 3 опубликованы в журналах, которые входят в Scopus (2) и перечни рецензируемых научных изданий ВАК (1), в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав материалы и методы, результаты собственных исследования, обсуждения результатов исследования, заключения, практических рекомендаций, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 69 рисунками и 16 таблицами. Список литературы включает 328 источников, из них 57 отечественных и 271 зарубежный.

Диссертация соответствует паспорту специальности:

14.03.02 Патологическая анатомия в пунктах 2, 3, 4

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было проведено на биопсийном материале от 139 пациентов в возрасте от 18 до 94 лет (средний возраст $55,94 \pm 17,97$ лет) в период с января 2018 по декабрь 2020 гг. в ГБУЗ ГКБ №31 ДЗМ.

Для проведения клиничко-морфологического сравнительного анализа были сформированы следующие группы:

1. Пациенты с пищеводом Барретта без дисплазии ($n = 50$).
2. Пациенты с цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода без дисплазии ($n = 43$).
3. Пациенты с пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода с low-grade и high-grade дисплазией ($n = 18$).
4. Пациенты с цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода <1 см от ГЭП ($n = 28$).

Для выявления взаимосвязи между длиной сегмента метаплазии и морфологическими особенностями пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода были сформированы следующие группы:

1. Пациенты с цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода <1 см от ГЭП ($n = 28$).
2. Пациенты с коротким сегментом пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода ($n = 75$).
3. Пациенты с длинным сегментом пищевода Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода ($n = 36$).

Экспрессию иммуногистохимических маркеров для уточнения наличия и степени дисплазии сравнивали между 3 группами:

1. Пациенты с пищеводом Барретта и цилиндроклеточной метаплазией дистального отдела пищевода без дисплазии
2. Пациенты с low-grade дисплазией
3. Пациенты с high-grade дисплазией.

Всем пациентам выполнялась ЭГДС в белом свете с высоким разрешением. Использовалась видеоэндоскопическая система Olympus Medical Systems Corporation EVIS EXERA III с функцией двойной фокусировки изображения (Dual Focus) и поддержкой технологии узкоспектральной эндоскопии второго поколения (NBI).

Гистологический и иммуногистохимический методы

Биопсированные фрагменты слизистой оболочки пищевода, полученные при ЭГДС, помещались в забуференный нейтральный 10% раствор формалина для фиксации и после стандартной гистологической проводки были залиты в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 3-4 мкм были изготовлены с использованием ротационных микротомов Sacura и окрашены гематоксилином и эозином. ИГХ исследование антител к MUC2, MUC5AC, MUC6, p16, p53, Ki67, cyclin D1, β -catenin и AMACR проводилось с помощью иммуностейнеров «Leica Bond-maX» (Germany) и Ventana Bench Mark Ultra» (USA). Интерпретация результатов ИГХ исследования с указанными антителами осуществлялась с учетом локализации позитивных клеток (в поверхностном эпителии и в криптах, в участках дисплазии и вне этих участков) путем подсчета как количества окрашенных эпителиальных клеток на 100 клеток в 10 полях зрения (увеличение 400), так и интенсивности окрашивания. Полученные количественные результаты выражены в процентах. Полуколичественная оценка выраженности экспрессии производилась в баллах, где 0 — экспрессия в 0-4%, +1 — экспрессия в 5-50% клеток – очаговая экспрессия, +2 – экспрессия в 51-75% и +3 – экспрессия в >75% клеток. Для Ki67 выраженность экспрессии оценивалась следующим образом: 0 – экспрессия в 0-20% клеток, +1 – экспрессия в 21-50% клеток, +2 – экспрессия в 51-75% клеток, +3 – экспрессия в >75% клеток. Интенсивность экспрессии маркеров оценивалась в баллах, где 0 — отсутствие экспрессии, 1 — слабое (бледное) окрашивание клеток, 2 — умеренное окрашивание клеток, 3 — интенсивное (яркое) окрашивание клеток.

Морфометрический метод

Морфометрический подсчет БК осуществляли по методике, описанной **Srivastava A. et al. (2015)**. Определяли общее число БК, число крипт, в которых есть хотя бы 1 БК, и общее число крипт вне дисплазии и в участках дисплазии. Плотность БК рассчитывали как среднее число БК на 1 крипту, то есть отношение общего числа БК к общему числу крипт. Выделяли пациентов с единичными БК (ЕдБК: плотность БК <0,25 БК в 1 крипте), низкой плотностью БК (НПБК:

плотность БК 0,25-2 БК в 1 крипте) и высокой плотностью БК (ВПБК: плотность БК >2 БК в 1 крипте). Также рассчитывали относительное число крипт, содержащих хотя бы 1 БК (число крипт, содержащих ≥ 1 БК/общее число крипт).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения StatSoft STATISTICA, v.10. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – статистическая погрешность среднего, а также в виде $Me (L-N)$, где Me – медиана, L – 25 нижний квартиль, N – 75 верхний квартиль. Достоверность различий средних величин рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с использованием непараметрического критерия Манн-Уитни. Связь между изучаемыми параметрами оценивали по результатам корреляционного анализа с вычислением рангового коэффициента корреляции Спирмана (r). Количественно корреляционная связь оценивались следующим образом: прямая связь: сильная (0,99-0,70), умеренная (0,69-0,30), слабая (0,29-0,01) и обратная связь: сильная (-0,99--0,70), умеренная (-0,69--0,30), слабая (-0,29--0,01). При сравнении частоты качественных переменных использовали метод четырехпольных (2x2) и многопольных (3x2, 3x3, 3x4) таблиц сопряжения с вычислением точного критерия Фишера. Для выявления связи между фактором риска и исходом вычисляли отношение шансов. Различия считались статистически достоверными (статистически значимыми) при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование вошли пациенты с разной длиной сегмента ПБ и ЦМДОП, а также с метаплазией ДОП < 1 см от ГЭП. В большинстве случаев патоморфологическая диагностика ПБ и ЦМДОП не вызывала затруднений. Дифференциально-диагностические трудности возникли в 17 (15,31%) случаях и были связаны с интерпретацией единичных клеток, напоминающих БК. После ИГХ исследования с MUC2 в 6 наблюдениях был диагностирован ПБ с ЕдБК, а в 11 случаях – ЦМДОП с наличием псевдо-БК.

В исследовании сравнивали распространенность разных типов метаплазии и распределение плотности БК при КМ у пациентов с

разной длиной сегмента метаплазии: <1 см от ГЭП, при коротком и длинном сегменте ЦМДОП и ПБ. С увеличением длины сегмента нарастало относительное число случаев с КМ: с 28,57% при метаплазии <1 см от ГЭП, до 46,67% при коротком и 88,89% при длинном сегменте метаплазии ДОП. При длинном сегменте метаплазии КМ выявлялась значительно чаще, чем при коротком и при метаплазии <1 см от ГЭП (точный критерий Фишера, $p < 0,0001$), ОШ (длинный/короткий сегмент) составило 9,143 (95%ДИ 2,94-28,42, $p < 0,05$). Это согласуется с результатами исследований зарубежных авторов (Gatenby P.A., 2008, Harrison R., 2007, Oberg S., 2001).

С увеличением длины сегмента метаплазии нарастало не только относительное число случаев с КМ, но и плотность БК в биопсированных фрагментах слизистой оболочки ДОП: при длине метаплазии < 1 см ЕдБК и НПБК встречались одинаково часто, при коротком сегменте ПБ чаще выявлялась НПБК, в то время как в длинном сегменте ПБ преобладала ВПБК (точный критерий Фишера, $p < 0,0001$), (Рисунок 1). Theodorou D. et al. (2012) продемонстрировали аналогичные результаты: с нарастанием длины сегмента увеличивалось относительное число крипт с БК, что было связано со значением внутрилюминального рН и градиентом растворимости желчных кислот вдоль сегмента ПБ. Таким образом, количественные показатели БК являются отражением адаптации слизистой оболочки ДОП к агрессивному действию рефлюксного содержимого.

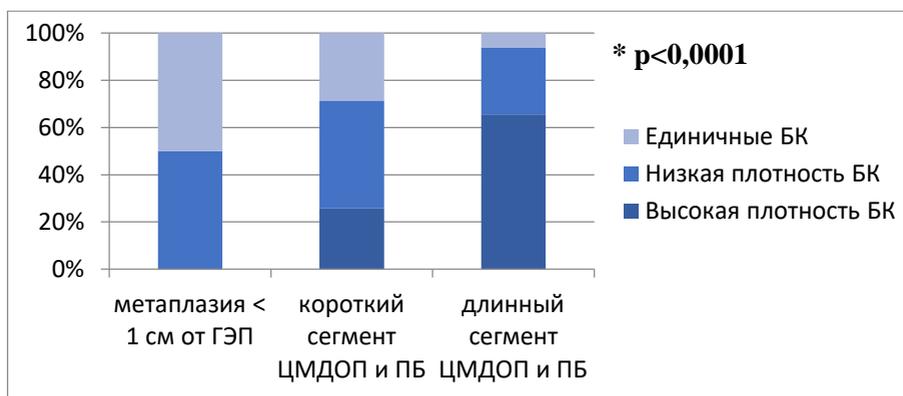


Рисунок 1 – Распределение плотности БК при разной длине сегмента метаплазии ДОП.

При корреляционном анализе нами впервые получена прямая корреляционная связь между морфометрическими параметрами БК (общее число БК, плотность БК, относительное число желез с наличием БК) и длиной сегмента метаплазии (эндоскопические параметры С и М) у пациентов с ПБ без дисплазии (Таблица 1).

Наиболее сильная корреляционная связь получена между общим числом БК и длиной циркулярного сегмента метаплазии (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r_1 = 0,67$, $p < 0,0001$), а также между общим числом БК и длиной максимального участка метаплазии ($r_2 = 0,64$, $p < 0,0001$). Лишь немного слабее была связь между плотностью БК и эндоскопическими параметрами С и М ($r_3 = 0,62$ и $r_4 = 0,60$, соответственно, $p < 0,0001$).

Таблица 1 – Результат корреляционного анализа с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена для установления связи между длиной сегмента ПБ и морфометрическими показателями БК.

	Общее число БК	Плотность БК	Относительное число крипт с БК
Плотность БК	0,84*		
Относительное число крипт с БК	0,78*	0,92*	
Длина циркулярного сегмента (С)	0,67*	0,62*	0,50*
Длина максимального участка метаплазии (М)	0,64*	0,60*	0,48*

* $p < 0,0001$

При ПБ и ЦМДОП выявлено 18 случаев дисплазии (16,22%): 16 наблюдений LGD и 2 – HGD. Подавляющее большинство случаев дисплазии (94,44%) развились на фоне ПБ (точный критерий Фишера, $p = 0,0007$). По данным **Bhat S. et al. (2011)** частота развития HGD/АКП у пациентов с ПБ составила 0,38% в год, а при желудочной метаплазии – 0,07% в год. Однако **Lavery D.L. et al. (2016)** показали, что даже при наличии КМ АКП развивается из клеток с кардиальным фенотипом, а не кишечным. Возможно, КМ и БК как её проявление является эпифеноменом, связанным с длиной сегмента метаплазии, а не источником происхождения АКП (**Watanabe G., 2015**).

При помощи ИГХ исследования с маркерами желудочной и кишечной дифференцировки можно оценить иммунофенотип дисплазии (**Khor T.S., 2012, Watanabe G., 2015**). В нашем исследовании в 3 случаях (16,67%) выявлена фовеолярная дисплазия с характерными гистологическими особенностями (наличием в эпителиальных клетках апикальной шапочки муцина, отсутствием стратификации ядер) и экспрессией маркеров только желудочной дифференцировки (MUC5AC и MUC6), в 15 наблюдениях (83,33%) выявлен кишечный гистологический тип дисплазии со смешанным иммунофенотипом (с экспрессией маркеров как желудочной (MUC5AC и MUC6), так и кишечной (MUC2) дифференцировки).

Из 3 случаев фовеолярной дисплазии выявлена 1 HGD и 2 LGD. HGD диагностирована на фоне ЦМДОП, 2 наблюдения LGD – на фоне ПБ с ЕдБК. Из 15 случаев дисплазии кишечного типа 14 наблюдений (93,33%) были представлены LGD и 1 (6,67%) HGD. Плотность БК была низкой в 6 случаях, высокой – в 8, единичные БК выявлены в 1 наблюдении. Таким образом, фенотип дисплазии был связан с наличием и плотностью БК: фовеолярный фенотип дисплазии выявлен у пациентов с ЦМДОП и ПБ с ЕдБК, кишечный фенотип обнаружен при НПБК и ВПБК.

Известно, что у пациентов с дисплазией и АКП общее число и плотность БК ниже, чем у пациентов с ПБ без дисплазии (**Kunze B., 2020, Schellnegger R., 2017, Srivastava A., 2015**). В нашем исследовании при ПБ с наличием дисплазии в корреляционном анализе связь между длиной сегмента метаплазии и морфометрическими параметрами БК отсутствовала. В длинном сегменте метаплазии ЕдБК и НПБК обнаруживались значительно чаще при ПБ с наличием дисплазии, чем при ПБ без дисплазии (точный критерий Фишера, $p = 0,0119$).

В биоптатах у 7 из 15 (46,67%) пациентов с дисплазией кишечного типа обнаружены клетки Панета. Они располагались в участках LGD, имели признаки ядерной атипии и в 2 наблюдениях присутствовали в виде кластеров. Клетки Панета обнаруживались значительно чаще при дисплазии, чем при ПБ без дисплазии (точный критерий Фишера, $p = 0,0011$). В крупном исследовании **Chen W. et al. (2015)** при ПБ без дисплазии клетки Панета встречались чаще, чем при АПК, а между группами ПБ без дисплазии и LGD статистически значимых различий не обнаружено. Наличие клеток Панета в

аденомах толстой кишки является маркером активации сигнального пути Wnt/ β -катенин и связано с повышенным риском развития колоректальной неоплазии (Pai R.K., 2013). Возможно, аналогичный механизм реализуется при дисплазии на фоне ПБ.

При ИГХ исследовании с маркерами p53, p16, Ki67, cyclin D1, β -catenin и AMACR наблюдались различия в выраженности экспрессии всех перечисленных маркеров между группами ПБ и ЦМДОП без дисплазии, LGD и HGD (Таблица 2).

Положительная экспрессия p53 у пациентов с ПБ и ЦМДОП без дисплазии не превышала 5% клеток, медиана 0,5% (0-5%). Уровень экспрессии p53 в участках LGD составил от 30 до 50% клеток, медиана 40 (35-50%), в участках HGD – от 70 до 100% клеток, медиана 82,5% (76,25-88,75%), нарастало как количество положительно окрашенных клеток, так и интенсивность окрашивания. По литературным данным, повышенная экспрессия p53 наблюдается при ПБ с дисплазией (Kaye P.V., 2009, 2016, Lörinc E., 2005, van der Wel M.J., 2020) и служит предиктором прогрессии (Davelaar A.L., 2015, Duits L.C., 2019, Kastelein F., 2013, Kerkhof M., 2008, Younes M., 2017).

При ПБ и ЦМДОП без дисплазии в 50% случаев наблюдалась ядерная экспрессия p16 в единичных эпителиальных клетках, в 50% наблюдений экспрессия p16 полностью отсутствовала. При LGD ядерная экспрессия p16 составила от 5 до 40% эпителиальных клеток, медиана 17,5% (10-25%), а цитоплазматическая экспрессия – от 15 до 40% клеток, медиана 15% (10-21,25%), однако в 43,75% наблюдений LGD экспрессия p16 отсутствовала. Таким образом, чувствительность этого маркера для определения дисплазии довольно низкая, что показано также в исследовании Shi X.Y. et al. (2008). При HGD ядерная экспрессия p16 выявлялась в диапазоне от 0 до 15% клеток, медиана 7% (5-10%), цитоплазматическая экспрессия – от 70 до 95% клеток, медиана 85% (80-90%).

При ПБ и ЦМДОП без дисплазии ядерная экспрессия Ki67 наблюдалась в 10-30% эпителиальных клеток, медиана 25% (11,25-30%), в основном в средней трети толщины слизистой оболочки, экспрессия Ki67 на поверхности отсутствовала во всех случаях. В участках LGD ядерная экспрессия Ki67 обнаруживалась в диапазоне от 50 до 69% эпителиальных клеток, медиана 60% (50-65%), включая от 5 до 15% эпителиальных клеток на поверхности, медиана 9,5% (7-

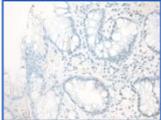
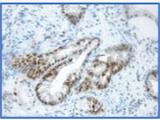
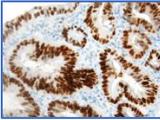
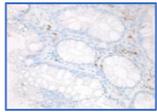
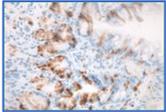
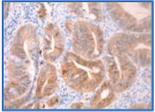
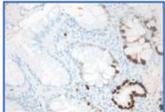
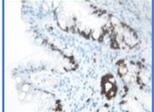
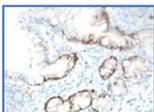
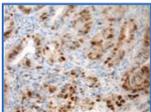
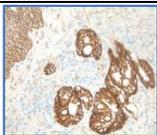
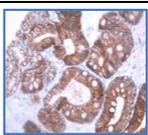
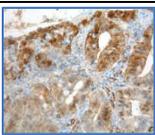
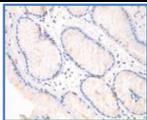
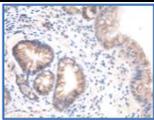
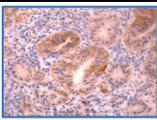
10%). В участках HGD ядерная экспрессия Ki67 составляла от 70 до 95% эпителиальных клеток, медиана 85% (81,25-90%), включая экспрессию на поверхности. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований (Демуря Т.А., 2008, Feith M., 2004, Kerkhof M., 2008, Shi X.Y., 2008, Sikkema M., 2009).

При ПБ и ЦМДОП без дисплазии ядерная экспрессия *suclin D1* составляла от 10 до 30% эпителиальных клеток, медиана 25% (15-30%). В участках LGD ядерная экспрессия *suclin D1* определялась в диапазоне от 50 до 69% эпителиальных клеток, медиана 52,5% (50-60%). В очагах HGD ядерная экспрессия *suclin D1* составляла от 70 до 95% эпителиальных клеток, медиана 85% (80-90%). Повышенная экспрессия *suclin D1* описана также в работах Kinra P. et al. (2018), Shi et al. X.Y. (2008) и van Dekken H. et al. (2008).

При ПБ и ЦМДОП без дисплазии, а также в большинстве случаев LGD определялась яркая мембранная экспрессия β -catenin. Лишь в 1 наблюдении LGD мембранная экспрессия β -catenin была слабой. В наблюдениях HGD обнаружена диффузная цитоплазматическая и очаговая ядерная экспрессия β -catenin. Показано, что в ряду LGD — HGD — АКП нарастает ядерная и уменьшается мембранная экспрессия β -catenin (Bian Y.S., 2000). Однако ядерная экспрессия β -catenin наблюдается лишь в части случаев LGD (van Dekken H., 2008). В нашей работе ядерная экспрессия β -catenin отсутствовала во всех случаях LGD и выявлялась только при HGD. Это может быть объяснено применением клона 17C2, в то время как в других исследованиях применяли клон 14.

Показано, что экспрессия AMACR отсутствует при ПБ без дисплазии и нарастает в ряду: LGD — HGD — АКП (Dorer R., 2006, Lisovsky M., 2006, Scheil-Bertram S., 2008). В то же время Strater et al. (2008) выявили слабую экспрессию AMACR в 83% случаев ПБ без дисплазии. В нашей работе при ПБ и ЦМДОП без дисплазии в 41% случаев наблюдалось фоновое окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток, при этом гранулярная экспрессия AMACR выявлялась в единичных клетках и составляла не более 10% эпителиальных клеток, медиана 0,5% (0-2%). При LGD гранулярная экспрессия AMACR наблюдалась в 15-35% эпителиальных клеток, медиана 20% (18,75-25%). При HGD гранулярная экспрессия AMACR выявлена в диапазоне от 50 до 80% эпителиальных клеток, медиана 70% (51,25±77,5%).

Таблица 2 – Уровни экспрессии маркеров при ПБ и ЦМДОП без дисплазии, LGD и HGD.

Маркер	Экспрессия при ПБ и ЦМДОП без дисплазии	Экспрессия при LGD	Экспрессия при HGD
p53	 0-15%	 30-50%	 70-100%
p16	 Ядерная: 0-5% Цитоплазматическая: 0%	 Ядерная: 10-50% Цитоплазматическая: 5-69%	 Ядерная: 0-15% Цитоплазматическая: 70-95%
Ki67	 10-30%	 50-69%	 70-95%
Cyclin D1	 10-30%	 50-69%	 70-95%
β -catenin	 Мембранная	 Мембранная	 Цитоплазматическая и ядерная
AMACR	 0-10%	 15-35%	 50-80%

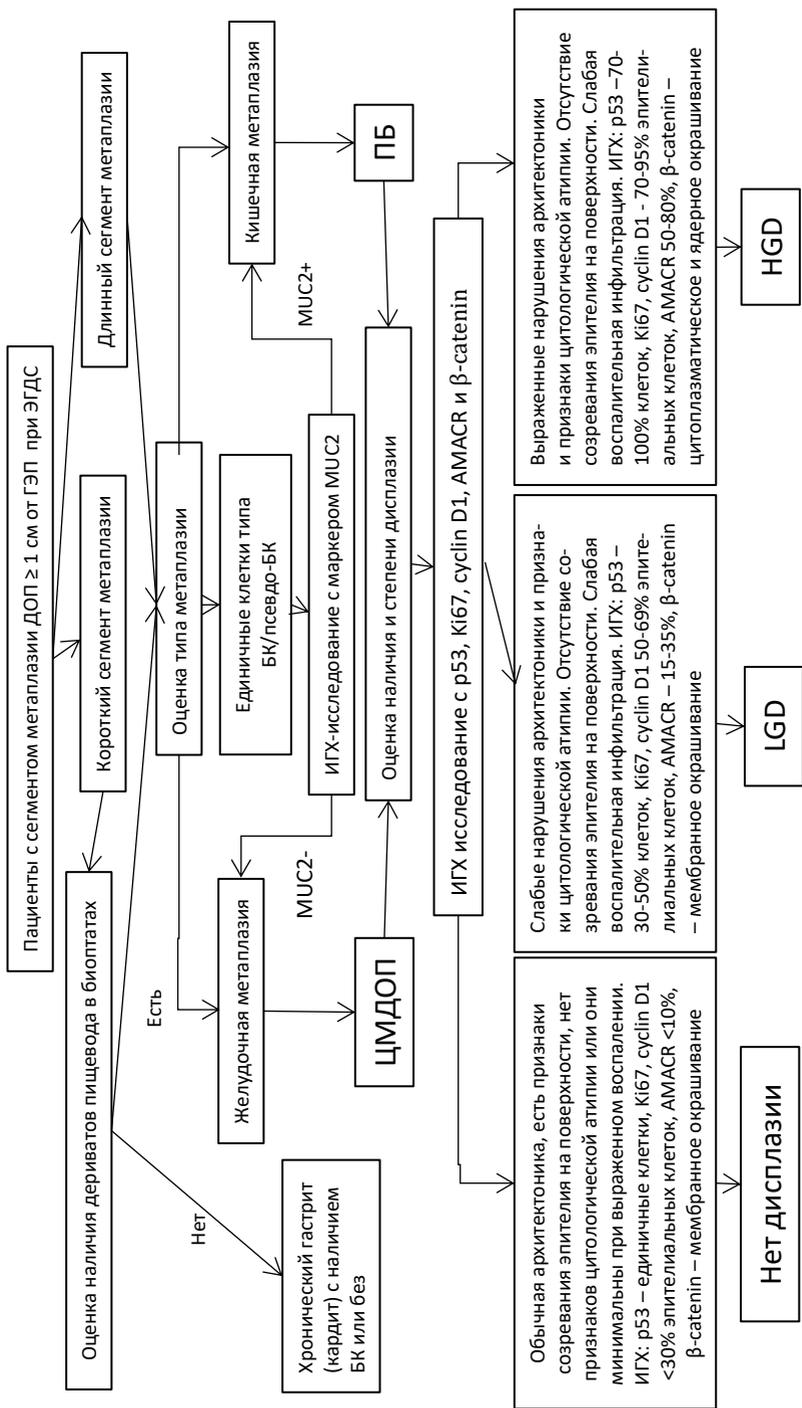


Рисунок 2 – Алгоритм патоморфологического и иммуногистохимического исследования при ПБ и ЦМДОП.

Патоморфологическая диагностика ПБ и ЦМДОП с определением наличия и степени дисплазии вызывает большие трудности. Однако именно наличие дисплазии позволяет стратифицировать риск малигнизации у этих пациентов. Нами разработан алгоритм патоморфологического и ИГХ исследования при ПБ и ЦМДОП, позволяющий оптимизировать диагностику дисплазии (Рисунок 2).

Использование ИГХ исследования с MUC2 позволяет проводить дифференциальную диагностику между ПБ и ЦМДОП при наличии единичных клеток, напоминающих БК. Применение иммуногистохимического исследования с маркерами p53, Ki67, cyclin D1, AMACR и β -катенин позволяет уточнить наличие и степень дисплазии у пациентов с ПБ и ЦМДОП, что влияет на выбор тактики лечения пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Желудочная метаплазия обнаруживается преимущественно в коротком сегменте цилиндроклеточной метаплазии пищевода, в то время как кишечная метаплазия встречается в 9 раз чаще при длинном сегменте метаплазии дистального отдела пищевода [отношение шансов 9,143 (95% доверительный интервал 2,94-28,42, $p < 0,05$)].
2. У пациентов с пищеводом Барретта без дисплазии с увеличением длины сегмента нарастает общее число и плотность бокаловидных клеток (коэффициент ранговой корреляции Спирмена между общим числом бокаловидных клеток и длиной циркулярного сегмента составил 0,67, а между общим числом бокаловидных клеток и длиной максимального участка метаплазии 0,64, $p < 0,0001$; коэффициент ранговой корреляции Спирмена между плотностью бокаловидных клеток и длиной циркулярного сегмента составил 0,62, а между плотностью бокаловидных клеток и длиной максимального участка метаплазии 0,60, $p < 0,0001$).
3. У пациентов с пищеводом Барретта и наличием дисплазии корреляционная связь между морфометрическими параметрами бокаловидных клеток и длиной сегмента метаплазии отсутствуют. Единичные бокаловидные клетки и низкая их плотность в длинном сегменте пищевода Барретта связаны с развитием дисплазии (точный критерий Фишера, $p = 0,0119$).

4. Фенотип дисплазии зависит от наличия и плотности бокаловидных клеток. Фовеолярный фенотип дисплазии наблюдается у пациентов с цилиндрической метаплазией дистального отдела пищевода и при пищеводе Барретта с единичными бокаловидными клетками. Кишечный фенотип выявляется при низкой и высокой плотности бокаловидных клеток.
5. При low-grade дисплазии кишечного типа значительно чаще встречаются клетки Панета, чем при пищеводе Барретта без дисплазии (точный критерий Фишера, $p = 0,0011$).
6. Иммуногистохимическое исследование с маркерами p53, Ki67 и cyclin D1 помогает уточнить наличие и степень дисплазии. Экспрессия этих маркеров градуально повышается в ряду: отсутствие дисплазии – low grade дисплазия – high-grade дисплазия. А для дифференциальной диагностики между low-grade и high-grade дисплазией, кроме перечисленных маркеров, имеет значение экспрессия β -catenin и AMACR.

Практические рекомендации

1. При исследовании биоптатов пищевода, особенно при коротком сегменте метаплазии и нерегулярной Z-линии, необходимо обращать внимание на наличие дериватов пищевода для подтверждения места взятия материала в пищеводе и дифференциальной диагностики с хроническим гастритом.
2. При наличии в биоптатах метаплазированной слизистой дистального отдела пищевода единичных клеток, напоминающих бокаловидные клетки, требуется проведение иммуногистохимического исследования с MUC2 для уточнения патоморфологического диагноза.
3. Для уточнения наличия и степени дисплазии в биоптатах метаплазированного дистального отдела пищевода целесообразно проведение иммуногистохимического исследования с маркерами p53, Ki67, cyclin D1, AMACR и β -catenin (см. Алгоритм патоморфологического и иммуногистохимического исследования при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии дистального отдела пищевода).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук

1. Войтковская К.С. (Маслénкина К.С.) Иммуногистохимическое исследование при оценке риска опухолевой прогрессии пищевода Барретта / Михалева Л.М., Войтковская К.С., Гушин М.Ю. // **Клиническая медицина**. – 2019. – Т. 97. – № 4. – С. 252-259. DOI: 10.34651/0023-2149-2019-97-4-252-259
2. Войтковская К.С. (Маслénкина К.С.) Цилиндроклеточная метаплазия и пищевод Барретта: морфологическая неоднородность и иммуногисто-химический фенотип / Михалева Л.М., Войтковская К.С., Федоров Е.Д., Грачева Н.А., Бирюков А.Е., Шидии-Закруа А.В., Гушин М.Ю. // **Вестник РГМУ**. – 2019. – № 6. – С. 83-89. DOI: 10.24075/vrgmu.2019.086
3. Войтковская К.С. (Маслénкина К.С.) Клинико-морфологический анализ дисплазии при пищеводе Барретта и цилиндроклеточной метаплазии / Михалева Л.М., Войтковская К.С., Федоров Е.Д., Бирюков А.Е., Грачева Н.А., Щеголева Н.Н., Чиграй Л.В., Шидии-Закруа А.В. // **Альманах клинической медицины**. – 2020. – Т. 48. – № 2. – С. 94-101. DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-011

Другие публикации

1. Voytkovskaya K. (Maslyonkina K.) Columnar-lined oesophagus less than 1 cm above gastro-oesophageal junction and Barrett's oesophagus: morphological features / Mikhaleva L., Fedorov E., Shidii-Zakrua A. // *Virchows Arch*. – 2019. – V. 475 (Suppl 1). – P. 273.
2. Voytkovskaya K. (Maslyonkina K.) Dysplasia in patients with Barrett's oesophagus / Mikhaleva L., Voytkovskaya K., Fedorov E., Shidiy-Zakrua A. // *Virchows Arch*. – 2020. – V. 477 (Suppl 1). – P. 190.
3. Маслénкина К.С., Михалева Л.М. Пищевод Барретта и цилиндроклеточная метаплазия как предраковые состояния пищевода / Маслénкина К.С., Михалева Л.М. // **Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины**. – 2020. – Т. 10. – №3. – С. 101.
4. Войтковская К.С. (Маслénкина К.С.) Особенности дисплазии при цилиндроклеточной метаплазии пищевода и пищеводе Барретта /

Войтковская К.С., Михалева Л.М. // «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сб.науч.трудов. – С. 29-30 (12-13 ноября 2020 года, г. Москва).

Патент на изобретение:

Способ диагностики степени дисплазии при пищеводе Барретта// Патент России №2741207 от 22.01.2021 г./ Михалева Л.М., **Войтковская К.С. (Маслénкина К.С.)**, Федоров Е.Д., Грачева Н.А., Бирюков А.Е., Шидии-Закруа А.В.

Список сокращений:

АКП – аденокарцинома пищевода

БК – бокаловидные клетки

ЕдБК – единичные бокаловидные клетки

НПБК – низкая плотность бокаловидных клеток

ВПБК – высокая плотность бокаловидных клеток

ГЭРБ - гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

ГЭП – гастроэзофагеальный переход

ДОП – дистальный отдел пищевода

ИГХ исследование – иммуногистохимическое исследование

ДИ – доверительный интервал

КМ – кишечная метаплазия

ОШ – отношение шансов

ПБ – пищевод Барретта.

ЦМ – цилиндроклеточная метаплазия

ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия

LGD – low-grade дисплазия (дисплазия низкой степени)

HGD – high-grade дисплазия (дисплазия высокой степени)

AMACR - α -метил-КоА-рацемеза

β -catenin – β -катенин

Cyclin D1 – циклин D1

Ki67 – маркер Ki67

MUC2 – муцин 2

MUC5AC – муцин 5AC

MUC6 – муцин 6

p53 – белок p53

p16 – белок p16