

## ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС МНОГОСЛОЙНОГО ПЛОСКОГО ЭПИТЕЛИЯ ПИЩЕВОДА БАРРЕТТА

Г. М. Могильная<sup>1</sup>, В. Л. Могильная, Л. Г. Дряева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО “Кубанский государственный медицинский университет”

Минздравсоцразвития России, г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup>МБУЗ Городская больница № 2 (КМЛДО), г. Краснодар, Россия

Методами Работа посвящена гистохимической характеристике многослойного плоского эпителия пищевода Барретта (ПБ) при его неопластической прогрессии. При наличии в зоне ПБ желудочной и интестинальной метаплазии участки сохранившегося многослойного эпителия дифференцируются одно-типно: распределение суммарного и катионного белка в них совпадает, тогда, как уровень содержания аминокислотных остатков в направлении от желудочной метаплазии к интестинальной снижается. При наличии аденокарциномы происходит падение содержания суммарного белка, накопление основных аминокислотных остатков в герминативной зоне и изменение молекулярного статуса ядерного хроматина.

*Ключевые слова:* многослойный плоский эпителий, пищевод Барретта, аденокарцинома пищевода.

© G. M. Mogilnaya, V. L. Mogilnaya, L. G. Dryayeva, 2012

Histochemical Status of Stratified Squamous Epithelium in Barrett's Esophagus

The work is devoted to histochemical characterization of stratified squamous epithelium of Barrett's esophagus (BE) during its neoplastic progression. In the presence in the BE area of gastric and intestinal metaplasia the parts of the preserved multilayered epithelium are differentiated by one type: the distribution of total and cationic protein in their matches, while the levels of amino acids is reduced. In the presence of adenocarcinoma is the content of total protein of the drops, the accumulation of basic amino acid residues in the germinal zone and the molecular status of the nuclear chromatin changes.

*Keywords:* stratified squamous epithelium, Barrett's esophagus, adenocarcinoma of the esophagus.

### Введение

Гетерогенность структурной организации слизистой в условиях развития пищевода Барретта (ПБ) известна [2, 3, 4, 7, 8], при этом считают, что метапластические зоны ПБ – это результат трансформации многослойного эпителиального пласта в однослойный цилиндрический. Поскольку структурные и молекулярные преобразования, захватывающие эпителиоциты метапластических зон приводят к развитию дисплазии, а в некоторых случаях и к аденокарциноме, то этот путь обозначен в виде следующей схемы: метаплазия–дисплазия–аденокарцинома. Однако при каждой из упомянутых морфологических форм ПБ сохраняются зоны, выстланные многослойным плоским эпителием. Морфологически эти зоны интерпретируют как участки неизмененного эпителия пищевода. Однако Scaughter et al. [6] еще в 1953 году писали о генетической альтерации в морфологически нормальной ткани, окружающей зону опухоли. Эти участки получили название “поля эффектов” и позже были описаны многими авторами при различных формах рака. Вместе с тем в литературе сведения о карциногенном эффекте “полей” при ПБ отсутствуют. Таким обра-

зом, возникает вопрос: действительно ли сохранившийся эпителиальный пласт соответствует нормальному или же изменения имеют место, и в чем они проявляются.

Настоящее исследование посвящено гистохимическому и иммуноцитохимическому изучению эпителиоцитов дифференцированных слоев многослойного плоского эпителия ПБ в зонах желудочной и интестинальной метаплазии, а также при наличии аденокарциномы.

### Материал и методы исследования

Материалом для исследования служили фрагменты пищевода, полученные от 9 здоровых человек (контрольная группа), а так же биопсии от 57 пациентов с различными типами ПБ: 22 пациентов с желудочной метаплазией, 32 больных с интестинальной метаплазией и 3 пациентов с аденокарциномой. Материал заливали в парафин. Окраску срезов проводили гематоксилином–эозином и по Ван Гизону. Для избирательного обнаружения ДНК использовали срезы, окрашенные по методу Фельгена. В работе применялся также комплекс гистохимических методов, принятых для выявления суммарного и катионного белков, а так же основ-

ных аминокислотных остатков [1, 5]. Изучение оптической плотности ядер эпителиоцитов в дифференцированных слоях эпителиального пласта проведено с использованием метода компьютерной морфометрии по программе "M-SCAN", разработанной на кафедре гистологии КГМУ. В работе использован так же иммуноцитохимический метод обнаружения пролиферативного индекса Ki-67. Для иммуногистохимического выявления Ki-67 использовали моноклональные антитела (Novocastra). Индекс пролиферации рассчитывали как долю (в %) положительно окрашенных ядер эпителиоцитов в 10 случайно выбранных полях зрения ( $\geq 1000$  клеток).

### Результаты и их обсуждение

Многослойный плоский эпителий на сохранившихся участках слизистой оболочки при наличии желудочной метаплазии в ПБ по своим гистохимическим свойствам напоминает нормальный пласт. Так, при выявлении суммарного белка БФС рН 2.2 многослойный неороговевающий эпителий пищевода окрашивается интенсивно, причем защитная зона отличается более высоким уровнем содержания белка, чем герминативная. Вместе с тем при выявлении основных аминокислотных остатков лизина и гистидина с окрашиванием проционовым красным при рН 5.6 продукт реакции распределялся диффузно. Лишь в отдельных участках эпителия удавалось отметить несколько более интенсивное окрашивание клеток папиллярного слоя. Дезаминирование предотвращает реакцию, за исключением самых поверхностных эпителиоцитов защитной зоны, цитоплазма которых сохраняет слабую окраску, что свидетельствует о присутствии в составе их белка аминокислотных остатков гистидина. Структуры, утратившие цветной продукт реакции, содержат аминокислотные остатки лизина. Присутствие последних подтверждается и результатами окраски тиразиновым красным при рН 8.2 с контрольным дезаминированием. Свободный катионный белок сохраняется в основном в герминативной зоне. Сульфгидрильные группы цистеина накапливаются преимущественно в эпителиоцитах защитной зоны. Дисульфидные группы цистина в эпителии пищевода не выявляются.

При наличии интестинальной метаплазии сохранившиеся участки многослойного плоского эпителия характеризуются высоким уровнем содержания суммарного белка. Распределение продукта реакции носит диффузный характер, на отдельных участках эпителиоциты герминативной зоны обнаруживают несколько меньший уровень содержания суммарного белка, чем защитная зона. Анализ распределения основных аминокислотных остатков у этой группы пациентов по сравнению с предыдущей установил отличия. Так у части пациентов (47%) с интестинальной метаплазией выявлено снижение уровня содержания основных аминокислотных остатков в клетках герминативной зоны. При этом для клеток поверхностных слоев характерно распределение продукта реакции по следующей схеме: четко выделена периферия клетки, соответствующая ее границе; здесь интенсивность реакции слабая, цитоплазма этих же клеток обнаруживает лишь следы основных аминокислотных остатков. Катионный белок в реакции с БФС при рН 8.2 слабо или умеренно окрашивает клетки герминативной зоны и очень слабо – поверхностной. Для клеток этой зоны сохраняется эффект четко очерченных границ и следов окраски в цитоплазме поверхностных клеток. Таким образом, многослойный плоский эпителий пищевода на сохранившихся участках ПБ при наличии метаплазии сохраняет цитохимический градиент при избирательном выявлении основных аминокислотных остатков: умеренный уровень содержания в цитоплазме клеток базального компартмента, слабый – в клетках промежуточного слоя, а в поверхностной, или защитной зоне – в основном в области, прилежащей к межклеточным границам. Интересно отметить, что после дезаминирования, предотвращающего окраску аминокислотных остатков лизина, реакцию сохраняют лишь межклеточные границы.

При наличии аденокарциномы участки многослойного эпителия окрашиваются на суммарный белок диффузно, интенсивность реакции – от слабой до умеренной. Проционовый красный при рН 5.6 выявляет основные аминокислотные остатки в клетках герминативной зоны. При этом слабо или умеренно окрашены клетки интерпапиллярного базального слоя. По сравнению с предыдущей

Оптическая плотность ядер эпителиоцитов пищевода Барретта

Слои эпителия	Контроль	Желудочная метаплазия	Интестинальная метаплазия	Аденокарцинома
Базальный	0.52±0.08 N=1.08	0.64±0.09 P>0.05 N=1.3	0.68±0.1 P>0.05 N=1.4	0.79±0.2 P>0.05 N=1.66
Промежуточный	0.42±0.06	0.54±0.07 P>0.05	0.63±0.2 P>0.05	0.66±0.3 P>0.05
Поверхностный	0.38±0.04	0.43±0.05 P>0.05	0.51±0.6 P>0.05	0.59±0.4 P>0.05

Примечание: P – отличие от контроля; N – отношение оптической плотности ядер эпителиоцитов базального слоя к ОП лимфоцитов крови человека.

группой пациентов имеет место тенденция к увеличению содержания суммарного белка в клетках герминативной зоны. Катионный белок в целом распределен на протяжении многослойного пласта диффузно с окрашиванием продукта реакции от низкой до умеренной интенсивности, но более высокий уровень его в герминативной зоне сохраняется. Для поверхностных клеток характерным является сохранение положительной реакции на сульфгидрильные группы цистеина.

Изучение оптической плотности (ОП) ядер эпителиоцитов пищевода показало, что в норме дифференцированные зоны многослойного плоского неороговевающего эпителия характеризуются различной степенью ОП ядер, отражающей уровень упаковки их хроматина. При этом эпителиоциты базального слоя отличаются наиболее высокими показателями, и ОП для них в среднем составляет 0.52±0.08 у.е. В клетках парабазального (промежуточного) слоя несколько снижается уровень ОП (0.42±0.06 у.е.), и он приближается к показателю ядер клеток защитной зоны. При наличии ПБ с желудочной метаплазией сохранившиеся участки многослойного плоского эпителия характеризуются некоторым увеличением ОП ядер, но при сопоставлении этих показателей по дифференцированным слоям статистически достоверные отличия отсутствуют. Выявленные колебания ОП ядер при смещении эпителиоцитов от базального слоя к поверхности пласта, вероятнее всего, связаны со снижением чувствительности ДНП ядер эпителиоцитов к кислотному гидролизу; при этом за одно и то же время, регистрируемое условиями реакции Фельгена, гидролиз и фрагментация молекул хроматина изменяются, а его ОП снижается.

При наличии интестинальной метаплазии в зоне ПБ ОП ядер базального слоя составляет 0.68±0.1 у.е. (табл.). Смещение эпителиоцитов к поверхности пласта сопровождается сохранением градиента плотности ядер, выявленного в многослойном плоском эпителии ПБ при наличии желудочной метаплазии, то есть – снижение ОП к поверхности эпителиального пласта. При аденокарциноме пищевода многослойный плоский эпителий сохранившихся участков слизистой характеризуется увеличением ОП ядер эпителиоцитов в каждом из трех дифференцированных слоев. Эти результаты указывают на то, что здесь имеет место изменение макромолекулярного статуса хроматина, и уровень резистентности его к мягкому кислотному гидролизу повышается. Вместе с тем сопоставление ОП ядер эпителиоцитов базального слоя как пролиферирующей зоны с ОП ядер лимфоцитов человека позволили выявить для многослойного плоского эпителия ПБ в сравниваемом ряду патоморфологических форм следующие закономерности: увеличение плоидности ядер эпителиоцитов от 1.3 при метаплазиях (желудочной и интестинальной) до 1.66 при аденокарциноме, что свидетельствует о наличии выраженного статуса тетраплоидности ядер.

Иммуногистохимическое изучение распределения пролиферативного индекса Ki-67 (ядерная метка) показало, что среди 22 пациентов с желудочной метаплазией ПБ положительная реакция на Ki-67 была выявлена лишь в двух случаях, при этом реакцию обнаруживали в 20–25% ядер только железистых эпителиоцитов. В клетках зон многослойного эпителия реакция не обнаруживалась. Отсутствие окраски на Ki-67 в очагах мно-

гослойного эпителия было и в случае кишечной метаплазии ПБ. Однако при наличии в ПБ очагов низкой и высокой дисплазии, участки многослойного эпителия характеризуются появлением Ki-67-положительных ядер в 50–60% клеток базального слоя. При наличии высокой дисплазии число клеток, экспрессирующих Ki-67, возрастает до 80%. С переходом в аденокарциному активная экспрессия Ki-67 наблюдается не только в ядрах клеток базального, но и парабазального слоев.

### Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют считать, что многослойный эпителиальный пласт ПБ при наличии и желудочной, и интестинальной метаплазии характеризуется общностью черт гистохимической дифференцировки, что проявляется однотипностью распределения суммарного и катионного белков. Различия связаны с распределением аминокислотных остатков лизина, для которых характерно снижение уровня их содержания при наличии кишечной метаплазии. При этом несмотря на то, что у 50% пациентов происходит снижение уровня содержания лизина в эпителиоцитах герминативной зоны, цитохимический градиент в распределении основных аминокислотных остатков от базального слоя к поверхностному сохраняется. При наличии аденокарциномы пищевода участки сохранившегося многослойного пласта обнаруживают тенденцию к снижению уровня содержания суммарного белка и накоплению основных аминокислотных остатков в герминативной зоне. В этих условиях значительно возрастает ОП ядер, причем это увеличение регистрируется в ядрах всех дифференцированных

слоев, что указывает на изменение молекулярного статуса хроматина.

### Список литературы

1. *Иванов В. Б.* Применение проционовых красителей в гистохимии // Доклады АН СССР. 1961. Т. 137. С. 419–421.
2. *Glickman J., Jang A., Shamsafaei A. et al.* Expression of p 53-related protein p 63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders // Hum. Pathol. 2001. Vol. 32. P. 1157–1161.
3. *Chandrasoma P., Der R., Ma J. et al.* Histologic classification of patients based on mapping biopsies of gastroesophageal junction // Am. J. Surg. Pathol. 2003. Vol. 27. P. 929–936.
4. *Mc Manus, Olaru A., Meltzer S.* Biomarkers of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus // Canc. Res. 2004. Vol. 64. P. 1561–1569.
5. *Pearse A.* Histochemistry. Teoretical and applied. London, 1968. 561 p.
6. *Slaughter D., Southwick H., Smejkal W.* Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications multicentric origin // Cancer. 1953. Vol. 6. P. 963–968.
7. *Spechier S.* Barretts esophagus and esophageal adenocarcinoma: pathogenesis, diagnosis and therapy // Med. Clin. North Am. 2002. Vol. 86. P. 1423–1445.
8. *Srivastava A., et al.* Loss of goblet cell differentiation occurs with the progression of dysplasia in Barretts esophagus // Gastroenterology. 2006. 130. P. 264.

### Информация об авторах

**Могильная Галина Михайловна** – д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО “Кубанский государственный медицинский университет” Минздравсоцразвития РФ. 350063, г. Краснодар, ул. Седина, д. 4, КГМУ; e-mail: [luda\\_dom@mail.ru](mailto:luda_dom@mail.ru)

**Могильная Вера Леонидовна** – д.м.н., ассистент кафедры терапии № 1 ФПК и ППС ГБОУ ВПО “Кубанский государственный медицинский университет” Минздравсоцразвития РФ.

**Дряева Людмила Геннадиевна** – зав. патологоанатомическим отделением МБУЗ Городская больница № 2 (КМЛДО), г. Краснодар.

Поступила в редакцию 1.02.2012 г.