

На правах рукописи

КОКОСАДЗЕ

Наталья Валерьевна

**МАЛТ-ЛИМФОМА ЖЕЛУДКА: МОРФОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСНОВЫ ДИАГНОЗА НА МАТЕРИАЛЕ ГАСТРОБИОПСИИ**

14.00.14 -онкология

14.00.15 -патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва-2005

**Работа выполнена в отделении патологической анатомии опухолей человека
ГУ Российского онкологического научного центра им.Н.Н.Блохина
Российской Академии медицинских наук**

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Н.А.Пробатова

доктор медицинских наук, профессор Н.Н.Тупицын

Официальные оппоненты

член-корреспондент РАМН, профессор Г.А.Франк

доктор медицинских наук, профессор С.А.Маякова

**Ведущая организация - Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф.Владимирского
Росздрава**

**Защита состоится 3 февраля 2006г. в 10 часов на
заседании диссертационного совета (К.001.017.01.) при ГУ Российском
онкологическом научном центре им.Н.Н.Блохина РАМН (115478, Москва,
Каширское шоссе, 24).**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

**ГУ Российского онкологического научного центра им.Н.Н.Блохина РАМН
Автореферат разослан 27 декабря 2005г.**

**Ученый секретарь диссертационного совета
д.м.н., профессор**

Ю.А.Барсуков

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В связи с наметившейся тенденцией роста заболеваемости неходжкипскими лимфомами (НХЛ), составляющими около 5% всех злокачественных новообразований, проблемы морфологической диагностики первичных экстранодальных лимфом, а особенно первичных гастроинтестинальных лимфом, охватывающих от 24% до 37% всех экстранодальных поражений, привлекают большое внимание. В свою очередь, наиболее распространенной локализацией среди первичных гастроинтестинальных лимфом является желудок; эта локализация встречается более чем в половине случаев.

Морфологические особенности лимфомы желудка более тесно связаны со структурой и функцией MALT, чем с таковыми периферических лимфатических узлов. MALT-лимфома желудка представлена зрелоклеточными элементами, ей свойственны лимфоидные фолликулы и лимфоэпителиальные поражения, при этом гистологический диагноз MALT-лимфомы желудка ставится на основании совокупности морфологических признаков, так как ни один из них не является патогномоничным для этой лимфомы, что обуславливает трудности диагностики. Помимо зрелоклеточного облика неопластических элементов отмечается их полиморфизм, разнообразное их количественное сочетание.

Объективной трудностью диагностики является чрезвычайно малый объем материала гастробиопсий. Все признаки MALT-лимфомы, хорошо очерченные и описанные в операционном материале, могут быть слабо выражены или вообще отсутствовать в гастробиоптате. Таким образом, разработка совокупности надежных морфологических диагностических критериев по материалу гастробиопсий является чрезвычайно важной.

При диагностике MALT-лимфомы большое значение имеет иммуногистохимическое исследование, особенно в спорных случаях. **Детальная** морфологическая характеристика MALT-лимфомы и дифференциальная диагностика с реактивными лимфоидными инфильтратами (хронические гастриты), пери-

ферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами (включая лимфому из малых лимфоцитов, лимфому из клеток зоны мантии, фолликулярную лимфому 1-2 цитологической степени) чрезвычайно актуальна в связи с различным клиническим течением, прогнозом и лечебной тактикой.

Цель работы

Целью проводимого исследования явилась разработка морфо-иммунологических критериев диагностики MALT-лимфомы желудка и дифференциальной диагностики со сходными по гистологической картине процессами (реактивные инфильтраты, периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы желудка).

Задачи исследования

1. Изучить «пеструю» гистологическую картину MALT-лимфомы желудка с выделением основных морфологических признаков на материале гастробиопсий.
2. Изучить иммунологическую характеристику MALT-лимфомы желудка:
 - выраженность Т-клеточной реакции (Т-хелперы, Т-цитотоксические);
 - наличие фолликулярных дендритических клеток;
 - выраженность плазмноклеточной реакции.
3. Оценить диагностическую значимость при MALT-лимфоме желудка лимфоэпителиальных поражений и фолликулоподобных структур. Провести сравнительное изучение этих морфологических особенностей при MALT-лимфоме и других периферических мелкоклеточных лимфомах желудка.
4. Изучить соотношение мелко- и крупноклеточного (бластного) компонента в опухолевом инфильтрате, характер роста последнего.
5. В результате сравнительного изучения MALT-лимфомы желудка, других периферических мелкоклеточных В-клеточных лимфом и реактивных лимфоидных инфильтратов разработать их морфологические дифференциально-диагностические критерии.

Научная новизна

Разработан комплекс морфологических диагностических критериев MALT-лимфомы желудка для гастробиопсий на основе совокупности гистологических и иммуногистохимических особенностей опухолевых клеток, характера их роста. Кроме того, установлены наиболее информативные комбинации морфологических особенностей в дифференциальной диагностике с другими сходными по морфологической картине новообразованиями и реактивными лимфоидными инфильтратами. Определены возможности использования иммуногистохимического метода на замороженных и парафиновых срезах в целях диагностики и дифференциальной диагностики исследуемых лимфом.

Практическая значимость

Подробно представленные морфологические и иммуногистохимические особенности MALT-лимфомы желудка на материале гастробиопсий могут быть использованы в повседневной работе морфолога при дифференциальной диагностике с лимфоидноклеточными инфильтратами реактивного характера и периферическими мелкоклеточными лимфомами.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ. Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 3-м Европейском конгрессе по телепатологии «Гистологическая и цитологическая диагностика лимфопролиферативных заболеваний» (Италия, 2000г.), IX международной научной конференции «Новые направления и разработки в онкоморфологии» (Москва, 2003).

Апробация диссертации состоялась 29 июня 2005 года на совместной научной конференции отделения патологической анатомии опухолей человека, отделения эндоскопии, отдела клинической иммунологии, отделения химиотерапии гемобластозов НИИ КО РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, кафедры онкологии РМА ПО.

Объем и структура диссертации. Материал диссертации изложен на 137 страницах печатного текста. Из них текст собственно диссертации занимает

96 стр., приложение - 26 стр., список литературы - 13 стр. Диссертация иллюстрирована 40 рисунками, 1 диаграммой, 1 графиком, содержит 9 таблиц. Указатель литературы включает ссылки на 128 источников - 6 отечественных и 122 иностранных авторов. Работа состоит из 5 глав (обзора литературы, материала и методов, 2 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов) и выводов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Для решения поставленных задач был изучен гастробиопсийный материал от 115 больных с лимфоидноклеточным инфильтратом в слизистой оболочке желудка, из них 71 больной с MALT-лимфомой желудка, 23 больных с реактивными (неопухолевыми) лимфоидными инфильтратами, 21 больной с периферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами желудка не MALT-типа (фолликулярной лимфомой I, I-II цитологической степени, лимфомой из клеток зоны мантии), лимфомой Беркитта (см. диаграмму 1). В исследование вошло 48 мужчин и 67 женщин (соотношение 1:1,39 соответственно). Возраст больных колебался в пределах от 14 до 85 лет (средний возраст больных - 53 года). Больные обследовались в РОНЦ РАМН в период с 1995 по 2003 годы.

Из нашего исследования были исключены случаи диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы без мелкоклеточного MALT-компонента и случаи фолликулярной лимфомы III цитологической степени.

Материал обрабатывали с использованием гистологических и иммуногистохимических методов.

Гистологическое исследование.

Гистологическое исследование проводили в соответствии со стандартной схемой: материал гастробиопсий фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина (рН=7,0). Гистологические срезы толщиной 3-4 микрона окрашивали гематоксилином и эозином, метиловым зеленым и пиронином по Браше, акридиновым оранжевым.

На светооптическом уровне определяли наличие изъязвления, грануляционной ткани разной степени зрелости и фиброза, активность хронического гастрита (по выраженности инфильтрации слизистой оболочки нейтрофилами), плотность инфильтрата, клеточный состав по преобладающим цитологическим признакам (мелкоклеточный, из клеток средних размеров, смешанноклеточный), конфигурацию клеточных ядер, характер роста (очаговый, диффузный, диффузно-очаговый). На срезах, окрашенных метиловым зеленым и пиронином по Браше, определяли наличие плазмцитоподобной дифференцировки в клетках инфильтрата и присутствие плазматических клеток в поверхностных отделах собственной пластинки слизистой оболочки желудка (единичные рассеянные или в виде пласта). Цитоплазма этих клеток окрашивалась пиронином в розовый цвет различной степени выраженности.

Активность воспаления оценивали с помощью полуколичественного метода, используемого по рекомендации «Классификация и градация гастритов. Модифицированная Сиднейская система» 1996 года, для оценки степени выраженности активного хронического гастрита (слабая, умеренная, выраженная).

На срезах, окрашенных акридиновым оранжевым, определяли наличие *Helicobacter pylori* в слизи на поверхности и в просвете желез покровно-яточного эпителия, а также в клетках эпителия; степень обсемененности микроорганизмом оценивали полуколичественно (слабая, умеренная, выраженная) по критериям, также отраженным в Сиднейской Системе.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили в 88 случаях (53 случая MALT-лимфом, 22 случая реактивных лимфоидных инфильтратов, 13 случаев периферических мелкоклеточных В-клеточных лимфом) на криостатных и парафиновых срезах. Материал эндоскопического исследования разделяли на две части и параллельно запускали в обработку - замораживали для получения криосрезов и фиксировали в растворе формалина для дальнейшей обработки и получения парафиновых блоков. Криосрезы окрашива-

лись не прямой реакцией иммунофлуоресценции; парафиновые срезы - не прямым иммунопероксидазным методом (DAKO En Vision tm+ System).

При постановке не прямой реакции иммунофлуоресценции замороженные срезы (толщиной 4-6 микрон) помещали на обезжиренные предметные стекла и фиксировали в ацетоне в течение 10 минут при температуре 4°C. Дальнейшие этапы реакции проводились при комнатной температуре во влажной камере: срезы инкубировали в среде 199 (при pH=7,2-7,4) в течение 10 минут; наносили моноклональные антитела на 30 минут; отмывали 10 минут в среде 199. Затем наносили ФИТЦ-меченные F(ab)2-фрагменты антисыворотки против глобулинов белой мыши на 30 минут; отмывали в среде 199 в течение 10 минут. После чего срезы консервировали 50% глицерином на физрастворе, закрывали покровными стеклами. Готовые препараты просматривали на люминесцентном микроскопе "AxioPlan-2" Zeiss. В исследовании использовали широкую панель антител серии ICO (Медбиоспектр, Россия), «Сорбент» (Россия), Novocastra (Великобритания), DAKO (Дания). Для подтверждения гемопэтической природы опухоли и установления вариантов неходжкинских лимфом использовали следующие маркеры: антитела к линейным антигенам В-лимфоцитов CD 19, CD20, CD37; антитела к Т-антигенам CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Для визуализации плазматических клеток использовали антитело CD38; для определения фолликулярных дендритических клеток - антитела CD21 и CD23; в качестве дополнительных маркеров - антитела HLA-DR, CD 10.

В случаях отсутствия свежего биопсийного материала применялось иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов иммуноферментным методом. Парафиновые срезы (толщиной 4-5 микрон) монтировали на стеклах, обработанных поли-L-лизинном, затем подвергали депарафинизации в ксилоле (2 раза по 10 минут) и регидратации в спирте 96° (3 раза по 4 минуты). После промывания в дистиллированной воде (2 раза по 5 минуты) проводили блокирование активности эндогенной пероксидазы охлажденной 0,3% перекисью водорода в течение 10 минут с последующим ополаскивани-

ем и промыванием в дистиллированной воде 2 раза по 5 минут. Восстановление антигенной структуры ткани проводили с использованием Target Retrieval Solution (DAKO) (pH=6,0) в СВЧ-печи (мощность 130Вт) в течение 25 минут с последующим остыванием при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем промывали 2 раза в дистиллированной воде по 5 минут. Наносили (раскапывали) первичные антитела и инкубировали 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. После ополаскивания и промывания в Tris-HCL буфере (pH=7,6) 2 раза по 5 минут инкубировали с En Vision (DAKO) 30 минут, ополаскивали и промывали в буфере аналогичным образом. Затем наносили DAB (на 1 мл буфера - 1 капля хромогена) на 5 минут, после чего промывали в 2 сменах дистиллированной воды по 5 минут. После докраски гематоксином (в течение 30 секунд) с последующей промывкой в дистилляте (2 раза по 3 минуты) и промывке в водопроводной воде (2 раза по 3 минуты), срезы промывали в дистиллированной воде 2 раза по 3 минуты. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации (4 спирта по 5 минут) и промывания в ксилоле 2 раза по 5 минут, срезы заключали в канадский бальзам и накрывали покровным стеклом.

Антитела, используемые для данного этапа работы, приведены в таблице 1:

Название антитела	Клон	Разведение	Фирма-производитель антитела
CD20	L26	RTU	DAKO
CD3		RTU	DAKO
IgM	R1/69	1:50	DAKO
IgD	IgD26	1:50	DAKO
IgG		RTU	DAKO
Kappa light chains	R10-21-F3	RTU	DAKO
Lambda light chain	N10/2	RTU	DAKO

Сокращения: RTU - ready-to-use - готовые к употреблению.

Интерпретация результатов проводилась с использованием качественной оценки реакции: отрицательная(-), положительная (+).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфоиммунологическая характеристика MALT-лимфомы.

В исследование вошли 71 больной в возрасте от 14 до 83 лет, средний возраст больных составил 54,32. Большинство больных имели возраст в диапазоне 60-70 лет. Средний возраст соответствовал для мужчин - 51,78 лет, для женщин - 55,54 лет. В группе больных преобладали женщины, в соотношении 2,08:1.

Таблица 2. Распределение больных MALT-лимфомон желудка по возрасту и полу.

Возраст, годы	Мужчины	Женщины	Абс.	Проценты, %
10-19	1	1	2	2,82
20 - 29	2	2	4	5,63
30 - 39	1	8	9	12,68
40 - 49	6	6	12	16,9
50 - 59	2	6	8	11,27
60 - 69	9	14	23	32,39
70 - 79	2	10	12	16,9
80 - 89	0	1	1	1,41
Всего	23	48	71	100

Постоянным спутником MALT-лимфомы является активное хроническое воспаление, более чем в половине случаев ассоциированное с Нр-инфекцией; имеется дефект слизистой оболочки почти в 2/3 случаев.

Морфологическая картина MALT-лимфомы чрезвычайно полиморфна, так как состав опухолевого инфильтрата гетерогенный, и разные составляющие могут меняться в сочетаниях от случая к случаю. Нами оценивались следующие гистологические признаки:

1. клеточный состав по форме ядер лимфоидных клеток;
2. наличие моноцитоподобных В-лимфоцитов;
3. наличие плазматических клеток;
4. наличие плазмоцитоподобной дифференцировки опухолевых клеток;

5. лимфоэпителиальные поражения;
6. наличие фолликулов (реактивных, колонизированных);
7. наличие бластных клеток.

Цитологические характеристики неопластических клеток различались в ряде случаев. Мы проводили оценку клеточного состава по размеру, форме ядер, состоянию хроматина, количеству цитоплазмы, наличию плазмоцитоподобной дифференцировки.

В лимфоидноклеточных инфильтратах наблюдались следующие разновидности клеточной морфологии неопластических элементов:

1. Клетки преимущественно с округлыми ядрами (наиболее близкие по морфологии малому лимфоциту: с четкими контурами ядер, мелкодисперсным хроматином, ядрышки не визуализируются, цитоплазма клеток имела вид узкого, плохо контурируемый ободок цитоплазмы) - 5 случаев (7,04%).
2. Клетки с центроцитоидной морфологией (малые клетки с расщепленным ядром, с клиновидной формой ядер, умеренно диспергированным или гранулярным хроматином, незаметным ядрышком, умеренно-широким ободком цитоплазмы) - 7 случаев (9,86%).
3. Клетки со смешанной морфологией: клетки с округлыми и центроцитоидными ядрами - 53 случая (74,65%).
4. Клетки с неправильной формой ядер (когда было не возможно различить центроцитоидное расщепление; клетки с подобными ядрами были крупнее двух предыдущих категорий клеток, и в наибольшей степени отличались от неопухлевых аналогов - то есть были наиболее атипичными) - 6 случаев (8,45%).

Размер клеток опухоли колебался от мелкого, равного малому лимфоциту в 26 случаях (36,62%) до среднего, равного по размерам пролимфоциту и в 2 раза большему, чем малый лимфоцит - в 5 случаях (7,04%). В более чем половине случаев (40 случаев - 56,34%) наблюдался смешанный по размеру клеток инфильтрат, включающий малые и средние по размеру клетки.

Мы условно разделили MALT-лимфомы на 3 гистологические группы в зависимости от величины опухолевых клеток. По мере увеличения их размеров менялся цитоморфологический облик - форма ядер, состояние хроматина. С увеличением клеток нарастала степень цитологической атипичности, росло сходство с бластными клеточными формами.

Таблица 3. Морфология клеточных элементов лимфоидноклеточного инфильтрата MALT-лимфомы в 3-х выделенных группах.

	Из мелких клеток (26 случаев)	Смешанный (из мелких и средних клеток) (40 случаев)	Из средних клеток (5 случаев)
Клеточный состав по форме ядер:			
- округлые	4(15,4%)	1 (2,5%)	0
- окр./центроцитоподобные	17(65,4%)	35 (87,5%)	1
- центроцитоподобные	5(19,2%)	1 (2,5%)	1
- неправильные	0	3 (7,5%)	3

Как видно из табл.3, при малом размере преобладающих в инфильтрате опухолевых клеток в 17 из 26 случаев (65,4%) ядра были округлой и клиновидной формы, при этом ядра принимали клиновидную форму из-за расщепления (центроцитоподобная морфология). В этой группе не было ни одного случая с неправильной формой ядер у неопластических клеток.

В наиболее многочисленной группе (40 случаев) из смешанных (малых/средних) по размеру клеток большую часть - 87,5% - составляли случаи со смешанной морфологией ядер: с округлыми и с клиновидными.

В группе из преимущественно средних по размеру клеток (5 случаев) больше половины случаев (60%) демонстрировали неправильную форму ядер лимфоцитов.

Помимо преобладающих в каждой из выделенных групп клеток в опухолевом инфильтрате можно было видеть и клеточные элементы с иной морфологией.

Так в 25 случаях (35,21%) часть неопластических элементов имели облик моноцитоподобных В-лимфоцитов: ядро бобовидной или неправильной формы, цитоплазма широкая, бледно окрашиваемая. При этом в первой группе из мелких по размеру клеток моноцитоподобные В-клетки встречались реже (15,38%), во второй группе из смешанных по размеру клеток они встречались в 40% случаев, а в третьей группе из клеток среднего размера они имелись в 80% наблюдений (см.табл.4).

В большинстве наблюдений (85,9%) имелись плазматические клетки. Чаще они располагались тотчас под покровным эпителием в виде массивного пласта (46,47%), реже в небольшом количестве были рассеяны в поверхностных отделах собственной пластинки слизистой оболочки среди клеток лейкоцитарного ряда (39,43%). Ядра в них располагались эксцентрически, чаще были округлой или слегка неправильной формы, цитоплазма выглядела широкой, либо в виде ободка, либо в виде язычка пламени интенсивно розового цвета при окраске по Браше. В исследованных группах по мере увеличения размера клеток количество случаев с большим содержанием плазматических клеток в виде пластов под покровным эпителием снижалось, и составило 18 случаев (69,23%) для первой, 17 (42,5%) для второй, и 1 случай (20%) для третьей группы (см. табл.4).

Наряду с данными плазматоцитами среди опухолевого инфильтрата также встречались клетки с плазматоцитоподобной дифференцировкой - которые начинали приобретать некоторое сходство с плазматическими клетками. Плазматоцитоподобная дифференцировка наблюдалась в 15 случаях (21,13%).

Таким образом, в случаях с выраженной атипичной морфологией опухолевого инфильтрата чаще встречались моноцитоподобные В-клетки, а количество плазматических клеток прогрессивно уменьшалось. Плазматоцитоподобная дифференцировка неопластических элементов колебалась между 20-30% во всех 3 группах.

Таблица 4. Морфологические признаки лимфодноклеточного инфильтрата MALT-лимфомы в 3-х выделенных групп.

	Из мелких клеток (26 случаев)	Смешанный (из мелких и средних клеток) (40 случаев)	Из средних клеток (5 случаев)
Наличие моноцитoidных В-лимфоцитов	н-22 (84,6%) е-4(15,4%)	н-24 (60%) е-16 (40%)	н-1 е-4
Наличие плазматических клеток	н-1 (3,9%) ед-7 (26,9%) мн-18 (69,2%)	н-7 (17,5%) ед-16(40%) мн-17 (42,5%)	н-0 ед-4 мн-1
Плазмоцитондная дифференцировка	32%	18,2%	20%
Лимфоэпителиальные поражения	н-12 (46,2%) е-14(53,8%)	н-23 (57,5%) е-17 (42,5%)	н-1 е-4
Реактивные фолликулы -колонизированные	н-18 (69,2%) е-8 (30,8%) к- 3 (37,5%)	н-29 (72,5%) е-И (27,5%) к-7 (63,6)	н-4 е-1 к-1
Властные клетки	н-15 (57,7%) е-11 (42,3%) ед-81,8%	н-4 (10%) е-36 (90%) ед-38,9% пл-36,1%	н-0 е-5

Сокращения: н - нет; е - есть; ед - единичные; мн - множество; к - колонизированные фолликулы; пл - пласты бластных клеток более 20 клеток.

Лимфоэпителиальные поражения (LELs) - агрегаты из 3х и более клеток маргинальной зоны, разрушающие эпителий желез - были обнаружены в 36 случаях (50,7%). Разрушение желез выразалось в искажении очертания последних, стирании границ желез из-за размытости базальных мембран. Иногда очертания желез угадывались лишь по резидуальной базальной мембране или по единичным группам эпителиальных клеток с явлениями эозинофиль-

ной дегенерации. В 6 случаях (17,14%) имелись «бластные» LELs, образованные крупными бластными клетками (см.табл.4).

Из 71 случая в материале гастробиопсий фолликулы и фолликулоподобные структуры отсутствовали в 50 случаях (70,42%); в 10 случаях (14,09%) имелись реактивные фолликулы со светлыми центрами размножения из centroцитов и центробластов, наблюдались немногочисленные фигуры митоза, встречались единичные макрофаги с клеточным детритом в цитоплазме. Центры размножения могли быть окружены частично сохранившейся, истонченной зоной мантии. Клетки опухоли при этом диффузно распространялись в собственной пластинке слизистой оболочки и росли вокруг реактивных фолликулов.

Практически в половине случаев, имевших фолликулы (15,49%), наблюдалось явление колонизации лимфоидных фолликулов. Предсуществовавший зародышевые центры были заселены неопластическими мелкими клетками, в единичных случаях были окружены узкой зоной мантии. Небольшие островки резидуальных зародышевых центров иногда обнаруживались в колонизированных фолликулах. Таким образом, частота встречаемости лимфоидных фолликулов снижалась по мере укрупнения клеток, в то же время чем атипичнее были клетки инфильтрата, тем больше было случаев с колонизированными фолликулами (см. табл.4).

В неопластическом инфильтрате обычно имелись крупные клеточные формы, сходные по морфологии с центробластами или иммунобластами - бластные клетки с ядрами либо округло-овальной, либо слегка неправильной формы, и ядрышками в количестве 1-3 штук. Или с пузырьковидными ядрами округлой формы и 1 компактным, центрально расположенным ядрышком. В 36,62% случаев встречались единичные рассеянные крупные клеточные формы. В 8,45% случаев имелись группы бластных клеток в количестве менее 20. 9,86% случаев демонстрировали рассеянные единичные бласты в сочетании с группами менее 20 клеток. В 18,31% случаев имелись пласты или поля из бластных клеток в количестве более 20. Эти 13 случаев относились к

группе из смеси мелких и крупных (властных) клеток, они характеризовались в основном диффузным инфильтратом из округлых и центроцитоподобных клеток с полями бластов (см.табл.4).

Метод иммунофенотипирования применяли в 49 случаях MALT-лимфом желудка.

Неопластические элементы MALT-лимфомы не имели характерных патномоничных иммунологических признаков.

При реакции с общим лейкоцитарным антигеном (ОЛА) большинство опухолевых клеток демонстрирует диффузную мономорфную реакцию, реже (в 5 случаях - 11,9%) экспрессирующие этот антиген клетки образовывали крупные скопления среди желез.

Инфильтраты экспрессируют рап-В-клеточные маркеры (CD 19, CD20) - в большинстве случаев диффузный, плотный позитивный инфильтрат, редко в виде некоторой зональности на группах позитивных клеток по типу фолликулов.

Опухолевые клетки были С05-негативными во всех случаях.

Т-клеточный компонент встречался в большинстве случаев в виде единичных рассеянных клеток, при этом СВ8-цитотоксические лимфоциты слегка преобладали над С04-лимфоцитами-хелперами.

Реакция опухолевых клеток с CD23 более чем в 90% случаев была отрицательной.

Наличие ФДК в опухолевом инфильтрате исследовали с помощью антител к CD21 и CD23. ФДК были выявлены в 19 случаях. Они формировали сеть среди негативных клеток опухолевого инфильтрата, но чаще, в 17 случаях (89,47%) - образовывали рыхлые скопления, при этом в 5 случаях среди CD21-позитивного опухолевого инфильтрата, и в 12 случаях среди CD21-негативного инфильтрата.

Оценивалась реакция с CD38 как на опухолевых клетках, так и на плазмочитах. Реакция с опухолевыми клетками была негативной; CD38-

позитивные плазматические клетки располагались в поверхностных отделах слизистой оболочки в виде очаговых скоплений и пластов.

Все случаи были CD10-негативными; 1 случай с мозаичной позитивной реакцией на опухолевых клетках следует считать сомнительным.

В 35 случаях на парафиновых срезах исследовали экспрессию CD20, CD3, иммуноглобулинов (Ig) классов D, G и M, а также легких цепей иммуноглобулинов X и к. Во всех исследованных случаях была отмечена выраженная, отчетливая экспрессия CD20 на клетках опухолевого инфильтрата. CD3 экспрессировался на единичных рассеянных клетках среди В-клеток. Ig всех трех классов экспрессировались на поверхностных плазматических клетках. Экспрессии Ig опухолевыми клетками выявлено не было. Легкие цепи иммуноглобулинов X и к экспрессировались как на плазматических клетках, так и весьма слабо на лимфоидных неопластических клетках; однако не было выявлено рестрикции одной из цепей. Таким образом, на парафиновых срезах все исследованные случаи демонстрировали поликлональность плазмочитов, то есть экспрессировали Ig разных классов и не выявили рестрикции одной из легких цепей.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ MALT-ЛИМФОМЫ ЖЕЛУДКА И ПРОЦЕССОВ, БЛИЗКИХ ПО МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЕ

Реактивные лимфондные инфильтраты желудка

В исследование вошли 23 больных в возрасте от 18 до 85 лет, средний возраст больных составил 53,47. В группе больных преобладали мужчины, в соотношении 1,3:1.

Все исследованные случаи были представлены гастробиоптатами, в более чем половине случаев которых (56,52%) наблюдался дефект слизистой оболочки, выраженный в разной степени: от поверхностной эрозии до изъязвления. Все 23 случая имели признаки активного хронического воспаления, преимущественно умеренно и резко выраженного (39,13% и 56,52% соответ-

венно). В 22 случаях (95,65%) на поверхности эпителия в слизи и в просвете желез обнаруживался *Helicobacter pylori*, при этом степень обсемененности слизистой оболочки коррелировала с активностью воспаления (см.табл.5).

Таблица 5. Степень обсемененности хеликобактером слизистой оболочки желудка у больных с реактивными лимфоидными инфильтратами.

Степень обсемененности	Количество случаев	Абс, %
+ /слабая	10	45,46
++/умеренная	5	22,72
+++/резко выраженная	7	31,82
Всего	22	100

Характер роста инфильтрата был чаще очаговым (47,83%) или очагово-диффузным (39,13%). Диффузный характер инфильтрата наблюдали в 13,04%.

Лимфоидные клетки изученных инфильтратов имели преимущественно малые размеры (86,96%). Инфильтратов, состоящих из средних размеров клеток, среди изученных случаев не было.

Морфологические признаки реактивных лимфоидноклеточных инфильтратов были следующими: преобладали клетки с центроцитондной морфологией ядер, без признаков цитологической атипии, либо со слабо выраженной цитологической атипией.

Моноцитондные В-лимфоциты не обнаруживались ни в одном из исследованных инфильтратов.

Плазматические клетки во всех 23 случаях обнаруживались в большом количестве в виде пластов под поверхностным покровно-ямочным эпителием. Ни в одном случае не была выявлена плазмоднтоидная дифференцировка лимфоидных клеток инфильтратов.

Фолликулы обнаружены в 34,78% в виде округлых или слегка неправильных очертаний светлых центров размножения, имеющих типичный состав из centroцитов и центробластов с единичными макрофагами с широкой цито-

плазмой с фагоцитированными тельцами. Зародышевые центры были окружены неширокой, более плотной и темной при окраске гематоксилином и эозином зоной мантии из небольших лимфоидных клеток с округлыми ядрами. Ни один случай не имел признаков колонизации фолликулов.

Лимфоэпителиальные поражения имелись приблизительно в 1/5 случаев. LELs состояли из более чем 3-х небольших лимфоидных клеток, очертания желез были искажены. В основном наблюдалась инфильтрация эпителия желез сегментоядерными лейкоцитами - формирование так называемых крипт-абсцессов.

Единичные крупные (бластные) клетки имелись в 2 случаях (8,7%). Данные клетки имели облик центробластов или иммунобластов, были рассеяны среди мелкоклеточного инфильтрата.

С помощью метода иммунофенотипирования изучили 21 случай реактивных лимфоидных инфильтратов в материале гастробиопсий.

В 21 клетки инфильтрата экспрессировали общий лейкоцитарный антиген (ОЛА) - CD45, при этом положительная реакция выявлялась на всех клетках инфильтрата, имеющих, в основном, вид небольших групп или рыхлых размытых скоплений.

Наблюдался смешанноклеточный инфильтрат, где Т-лимфоциты преобладали над В-лимфоцитами, или реже находились в равном соотношении, при этом преобладали CD8-позитивные Т-лимфоциты.

Отмечалась негативная реакция клеток инфильтрата с CD21, CD23, CD5, CD10.

При реакции с CD21 и CD23 отмечалось наличие позитивной, хорошо выраженной, организованной сети ФДК реактивных фолликулов.

При реакции с CD38 отмечалась экспрессия на плазматических клетках.

Периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы желудка: лимфома из клеток зоны мантии, фолликулярная лимфома. Лимфома Беркитта.

В исследование вошли 21 больной в возрасте от 14 до 83 лет, средний возраст больных составил 48 лет. В группе больных преобладали мужчины, в соотношении 1,3:1. Отобранные для дифференциальной диагностики с MALT-лимфомой случаи были представлены периферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами, уступающими по частоте поражения желудка мальтоме: фолликулярная лимфома (ФЛ) I, I-II, II цитологической степени - 10 случаев, лимфома из клеток зоны мантии (ЛКМ) - 6 случаев. Кроме того, сюда условно вошли случаи лимфомы Беркитта (ЛБ) - 5 случаев, вследствие того, что данная нозология может иметь средние размеры неопластических клеток. Из нашего исследования исключили В-ХЛЛ, так как за период 1995 - 2003 не было ни одного случая поражения желудка при данной нозологии.

Все исследованные гастробиоптаты были представлены небольшими кусочками слизистой оболочки желудка из разных отделов. В двух третях исследованного материала отмечались дефекты слизистой оболочки от поверхностной эрозии до изъязвления. Активность воспаления при всех вариантах лимфом была слабой и умеренно выраженной. Обсемененность *Helicobacter pylori* наблюдалась в 8 случаях (38,1%).

При изучении плотности и характера роста инфильтратов было выявлено следующее: инфильтраты лимфом имели умеренную и выраженную плотность (38,1 и 61,9% соответственно). Характер роста при лимфоме из клеток зоны мантии и фолликулярной лимфоме был приблизительно в трети случаев очагово-диффузным, и в двух третях случаев - диффузным. При ЛБ характер роста во всех 5 случаях был диффузным.

Результаты сравнения морфологических признаков ФЛ, ЛКМ, ЛБ отражены в таблице 6.

Таблица 6. Периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы, лимфома Беркитта - морфологические особенности лимфоидноклеточных инфильтратов в слизистой оболочке желудка.

	Фолликулярная лимфома (10 случаев)	Лимфома из клеток зоны мантии (6 случаев)	Лимфома Беркитта (5 случаев)
1. Размер опухолевых клеток	Смешанный	Малые или средние	Средний
2. Моноцитонные В-лимфоциты	Имелись в 1 случае	Имелись в 1 случае	Отсутствовали
3. Плазматические клетки	Имелись в 7 случаях	Имелись в 2 случаях	Отсутствовали
4. Плазматоидная дифференцировка	Имелась в 1 случае	Отсутствовали	Отсутствовали
5. Лимфоэпителиальные поражения	Имелись в 4 случаях	Имелись в 1 случае (ед)	Имелись в 2 случаях
6. Лимфоидные фолликулы	Имелись в 2 случаях с признаками колонизации	Отсутствовали	Отсутствовали
7. Властные клетки	Имелись в 9 случаях	Имелись в 4 случаях	Имелись в 5 случаях

Сокращения: ед - единичные.

Среди периферических мелкоклеточных В-клеточных лимфом с помощью иммуногистохимического исследования изучалось 7 случаев фолликулярной лимфомы и 4 случая лимфомы из клеток зоны мантии. Иммунологически все изученные лимфомы (ЛКМ и ФЛ) были В-клеточными, с единичными или группами немногочисленных рассеянных Т-клеток. При этом диагноз ФЛ ставился на основании совокупности CD23, CD38, CD 10, встречающихся в различных сочетаниях. Следует отметить, что все 3 случая ФЛ желудка являлись CD10-негативными, при этом клетки опухолевого инфильтрата были

либо С038-позитивными, либо СБ23-позитивными. Для ЛКМ диагностически значимой являлась реакция с CD5: все случаи были позитивными.

Сравнительный анализ морфологических признаков лимфоидноклеточных инфильтратов в слизистой оболочке желудка при лимфомах и реактивных инфильтратах приведен в таблице 7.

Таблица 7. Диагностически значимые морфологические признаки.

	MALT-лпмфома	Реактивный лимфоидноклеточный инфильтрат	Другие лимфомы*
Моноцитoidные В-лимфоциты	35,2%	Отсутствуют	ФЛ-10% ЛКМ-16,6%
Плазматические клетки	85,9%	100%	ФЛ-70% ЛКМ-33,3%
Плазмoцитoidная дифференцировка	21,1%	Отсутствует	ФЛ-10% ЛКМ-отс
Лимфоэпителиальные поражения	50,7%	Единичные в 20%	ФЛ-40% ЛКМ-едв 16,6%
Лимфоидные фолликулы	30% из них 15% с колонизацией	30% без признаков колонизации	ФЛ-20% с колонизацией ЛКМ-отс
Властные клетки	73,2%	10%	ФЛ-90% ЛКМ-66,6%

* Другие лимфомы - включают ФЛ, ЛКМ.

Сокращения: отс - отсутствует; ед - единичные

Выводы

1. В результате гистологического анализа 71 случая MALT-лимфомы желудка на материале гастробиопсий установлено, что наиболее важным морфологическим критерием в оценке опухолевой ткани служат размеры опухолевых клеток. В зависимости от размеров преобладающих в опухолевом инфильтрате клеток выделено 3 группы: из мелких клеток, смешанный (из мелких и средних клеток), из средних по размеру клеток.

2. С увеличением размеров клеток меняется их цитоморфологический облик - форма ядер, состояние хроматина, а также нарастает степень цитологической атипичности.

3. Получены данные, свидетельствующие о том, что при наличии опухолевых клеток с выраженной атипичной морфологией в инфильтрате чаще встречаются моноцитoidные В-клетки (I группа - 15,38%, II группа - 40%, III группа - 80%), а количество плазматических клеток прогрессивно уменьшается (I группа - 69,23%, II группа - 42,5%, III группа - 20%). В то же время плазмoцитoidная дифференцировка неопластических элементов колеблется между 20-30% во всех трех группах.

4. Установлено, что реактивные лимфоидные фолликулы при MALT-лимфоме встречаются в 29,58% случаев, из которых чуть больше половины были с явлениями колонизации. Частота встречаемости лимфоидных фолликулов снижается по мере укрупнения опухолевых клеток, а количество колонизированных фолликулов возрастает.

5. Лимфоэпителиальные поражения (LELs) в препаратах гастробиопсий наблюдаются в 50,7% случаев и не являются патогномоничным для этой лимфомы, так как могут встречаться при других мелкоклеточных лимфомах (при фолликулярной лимфоме - в 40%, лимфоме из клеток зоны мантии - в 16,6% случаев) и даже в реактивных лимфоидных инфильтратах (17,39%).

6. Лимфоидные фолликулы чаще встречались в реактивных инфильтратах - 34,78%; при MALT-лимфоме несколько реже - в 29,58%, из которых чуть больше половины было с явлениями колонизации. При других лимфомах фолликулы имелись только в случаях ФЛ в 1/5 случаев, при этом с явлениями колонизации.

7. Подсчет количества бластных клеток в MALT-лимфоме предложено проводить с использованием комбинированных критериев: единичные рассеянные клетки, группы бластов менее 20 клеток, рассеянные клетки + группы менее 20 клеток, поля бластов более 20 клеток. Последняя группа должна ди-

агностироваться как «диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома с полями MALT-лимфомы».

8. Неопластические элементы MALT-лимфомы не имели характерных патогномоничных иммунологических признаков. Все они экспрессировали общин лейкоцитарный антиген, маркеры В-линейной дифференцировки. Т-клетки, чаще единичные, были рыхло рассеяны в В-клеточном инфильтрате, реже наблюдались скопления Т-клеток. Среди Т-клеточной популяции отмечалось незначительное преобладание Т8-лимфоцитов над Т4-лимфоцитами. Определялись ФДК, в основном в виде небольших рыхлых групп. CD38 определялся на плазматических клетках, которые располагались в поверхностных отделах в виде скоплений и пластов. Все исследованные случаи демонстрировали поликлональность плазматических клеток, то есть экспрессировали Ig разных классов и не выявили рестрикции одной из легких цепей. Таким образом, иммунологический диагноз должен основываться на выявлении нарушенной нммуоархнтектоннки при отсутствии выявления других иммунологических признаков.

9. Диагностика MALT-лимфомы желудка на материале гастробиопсий в ряде случаев является сложной, так как отдельные морфологические особенности, характерные для этой лнмфомы, могут наблюдаться и при других периферических мелкоклеточных лимфомах (атипичные мелкие лимфоидные клетки, реактивные фолликулы, LEL), в силу чего необходима оценка морфоиммунологической картины и не редко иммуногнстохимическое исследование является решающим в постановке диагноза.

10. Мелкоклеточные В-клеточные лимфомы, диагностируемые по материалу гастробиопсий, помимо экстранодальной лнмфомы маргинальной зоны MALT-типа включают фолликулярную лимфому и мантийноклеточную лимфому, которые могут иметь сходные с MALT-омами морфологические характеристики. Диагностическим признаком лимфом из клеток зоны мантии является экспрессия CD5 при отсутствии CD23, а фолликулярной лимфомы - CD 10, CD23, CD38 в различных сочетаниях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при MALT-лимфомах желудка. // "Естественные факторы защиты в профилактике и лечении иммунообусловленных заболеваний" Материалы научной конференции. Нижний Новгород, 2000. - с.94-95. /В соавт. А.М.Ковригина, М.А.Лукашина, А.Ю.Барышников и др./.
2. К дифференциальной диагностике первичных мальтом и centrofollikulyarnykh лимфом желудочно-кишечного тракта. // II съезд онкологов СНГ, 23-26 мая 2000г. - Киев, -с.611. /В соавт. Ковригина А.М., Пробатова Н.А., Шолохова Е.Н., и др./.
3. Проблемы морфологической диагностики мальтом. //II съезд онкологов СНГ, 23-26 мая 2000г. - Киев.-с.1301. /В соавт. Пробатова Н.А., Поддубная И.В., Ковригина А.М., и др./.
4. Особенности эндоскопической картины при MALT-лимфомах. // II съезд онкологов СНГ, 23-26 мая 2000г. - Киев.-с.634. /В соавт.Пробатова Н.А., Поддубная И.В., Ковригина А.М., и др./.
5. Expression p-53mut, bcI2, CD95 in gastrointestinal MALT-lymphoma. //Европейский конгресс по цитологии. Сентябрь 2000г, Норвегия. - р.412. /В соавт. А.Kovrigina, M.Lukashina, V.Bogatyrsev, и др./.
6. Первичные MALT-лимфомы желудка у пожнпыхУ/Сборник "Новое в онкологии" - №4 - 2001 г.-с.34-35. / В соавт.Поддубная И.В.,Пробатова Н.А., Османов Д.Ш., и др./.
7. Особенности клинического течения первичных MALT-лимфом желудка у больных пожилого возраста и возможности лечебной тактики.// "Клиническая геронтология" - том8, №1 2002г. - с.34-37. /В соавт.Москаленко О.А., Поддубная И.В., Османов Д.Ш., и др./.
8. MALT-лимфома желудка - основы морфологического диагноза.// "Архив патологии" - том 65, №5, 2003г.-с.6-11. /В соавт.Н.А.Пробатова, А.И.Павловская, А.М.Ковригина/.
9. MALT-лимфома желудка с выраженной плазмочитарной дифференцировкой: вариант опухоли из клеток Мота.// "Архив патологии" - том 66, №5, 2004г. - с.40-42. /В соавт.А.М.Ковригина, Ы.А.Пробатова/.
10. Особенности макроскопических проявлений MALT-лимфом желудка и трудности дифференциальной диагностикл. //У1 Российско-японский симпозиум по эндоскопии пищеварительного тракта "Актуальные вопросы эндоскопической диагностики и лечения раннего рака пищеварительного тракта", Сборник тезисов.2004г - Москва. - с. 15. /В соавт.Поддубный Б.К., Кувшинов Ю.П., Малихова О.А., и др./.
11. Эндоскопическая семиотика и диагностика MALT-лимфом желудка. // III съезд онкологов и радиологов СНГ. Материалы съезда, часть!! Минск 25-28.05.2004г. - с.298. /В соав.Б.К.Поддубный, Ю.П.Кувшинов, О.А.Малнхова, и др./.
12. Endoscopic semiotics and diagnostics MALT-lymphomas of stomach depending on their malignancy ratc. //The eleventh International Symposium of the Japan-Russia Medical Exchange. 10-11.08.2004, Niigata, Japan. /В соавт.О.Малихова, В.Poddubniy, Y.Kuvshinov, и др./.
13. Трудности дифференциальной диагностики и оценка эффективности лечения MALT-лимфом желудка. //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №23. Материалы Десятой Российской Гастроэнтерологической Недели, 25-28.10.2004г, Москва. - с. 140. /В соав. Поддубный Б.К., Кувшинов Ю.П., Малихова О.А., и др./.
14. Эндоскопические проявления и оценка эффективности лечения MALT-лимфом желудка. //VН Российский онкологический конгресс, 23-25.11.2004г, Москва. - с.227. /В соавт.Б.К.Поддубный, Ю.П.Кувшинов, О.А.Малнхова, и др./.
15. Современные уточняющие методы диагностики лимфом желудка в эндоскопии печатн. // "Клипическая эндоскопия", №1, 2005. - с.37. /В соавт.О.А.Малихова, Б.К.Поддубный, Ю.П.Кувшинов, и др./.
16. Роль эндоскопических уточняющих методов в диагностике MALT-лимфом желудка. // "Актуальные проблемы онкологии" Материалы I Конгресса онкологов Республики Узбекистан, Ташкент, 2005. - с.100-101. /В соавт.О.А.Малихова, Б.К.Поддубный, Ю.П.Кувшинов, и др./.
17. Эндосонография и эндоскопия с увеличением в диагностике лимфом желудка. // "НоВи.е технологии в онкологической практике" материалы Российской научно-практической конференции с международным участием. Барнаул, 7-8.06.2005. - с.252. /В соавт.О.А.Малихова, Б.К.Поддубный, Ю.П.Кувшинов, и др./.