

ОБЩИЙ РАЗДЕЛ

СТРОЕНИЕ ОРГАНОВ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЛИМФОЦИТОВ

Для понимания подходов к диагностике той или иной группы болезней необходимо знать морфологию и физиологию органов, которые они чаще всего поражают. Поэтому прежде чем пе-

рейти к рассмотрению частных вопросов опухолей лимфатической системы и отдельных нозологических форм рассмотрим строение, функцию и морфологию органов иммунной системы.

ЛИМФОУЗЛЫ

Лимфоузлы являются частью барьерной системы организма. После встречи с антигеном, происходящей обычно на уровне покровных тканей организма, и первичной реакции иммунокомпетентных клеток в покровных тканях, активированные Т-хелперы, Т-киллеры и вуалевые клетки с током лимфы поступают в региональный лимфоузел. Вуалевые клетки представляют собой стадию дифференцировки дендритных клеток, находящихся в подкожных и подслизистых слоях. В дендритных клетках, в том числе клетках Лангерганса, чужеродный антиген захватывается, переваривается с образованием коротких (до 28 аминокислотных остатков) пептидов, которые поступают в HLA-комплекс гистосовместимости первого и второго класса. Переваренный антиген презентруется в составе HLA-II комплекса Т-хелперам и в составе HLA-I – цитотоксическим Т-лимфоцитам. В процессе узнавания и переваривания антигена участвуют также макрофаги и В-лимфоциты. При значительном поступлении антигена к реакции присоединяются региональные лимфоузлы, в структурах которых под влиянием провоспалительных цитокинов, активированных Т-лимфоцитов и нагруженных антигеном дендритных клеток происходит целый ряд каскадных иммунных реакций как в Т-зависимых, так и в В-зависимых зонах лимфоузла. При поступлении больших количеств антигена непосредственно в кровоток и в селезенке, и в лимфатических узлах может осуществляться начальная фаза иммунного ответа.

Лимфоузлы человека представляют собой образования округлой или бобовидной формы, размером 2–8 мм или несколько больше (паховые лимфоузлы, особенно у мужчин, могут в

длину достигать 3–4 см). Снаружи узел покрыт соединительнотканной капсулой, через которую проходят приносящие (афферентные) лимфатические сосуды, открывающиеся в краевой синус. В области ворот капсула образует утолщение, через которое в паренхиму проникают кровеносные сосуды и выходит единственный выносящий (эфферентный) лимфатический сосуд (рис. 3). Паренхима лимфоузла разделена соединительнотканными перегородками – трабекулами. Она делится на наружную часть, называемую корковой, и внутреннюю – мозговую. Между ними находится паракортикальная зона. В корковой части располагаются, в основном, В-клетки, а в паракортикальной – преимущественно Т-клетки. Мозговая зона служит местом перемещения лимфоцитов, в ней присутствуют относительно многочисленные плазмоциты.

Увеличение лимфоузлов может носить реактивный характер, т. е. быть вызвано антигенной стимуляцией или воспалением. Кроме того, увеличение лимфоузлов может быть обусловлено метастазами рака, других опухолей и, прежде всего, – опухолей лимфатической системы. Поскольку разные структуры лимфоузла отвечают на антигенные воздействия неодинаково, границы отдельных зон могут полностью стираться, смещаться вследствие гиперплазии или, наоборот, гипоплазии той или иной субпопуляции лимфоцитов.

Корковое вещество лимфоузла содержит сферические скопления лимфоцитов: первичные (только у новорожденных) и вторичные фолликулы. Первичный фолликул состоит, в основном, из однотипных по своей морфологии В-клеток с плотным округлым ядром и узкой цитоплазмой. В состав первичного фолликула входят также

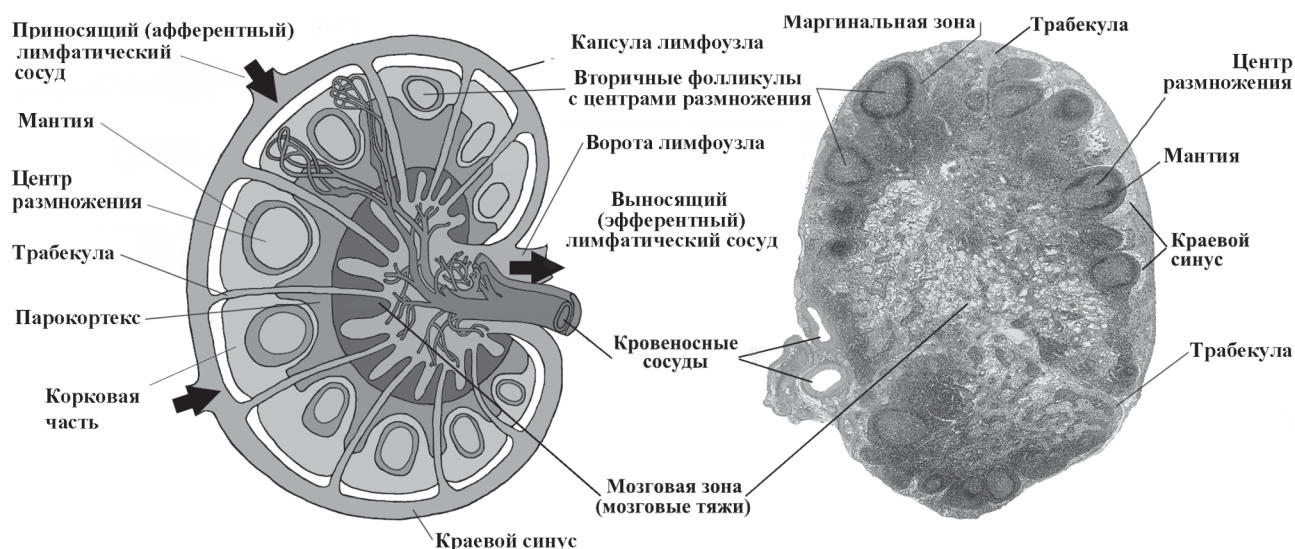


Рис. 3. Схематическое строение и гистологический срез реактивного лимфоузла (мал. ув.).

макрофаги, субпопуляция Т-клеток и фолликулярные дендритические клетки. Т-клетки первичных фолликулов продуцируют интерлейкины IL-4 и IL-6, необходимые для дифференцировки В-клеток. Фолликулярные дендритические клетки несут на своей поверхности рецепторы к иммуноглобулинам, комплементу, а также молекулы адгезии, обеспечивающие взаимодействие с В-клетками в ходе представления им антигена. Ядра фолликулярных дендритических клеток по размерам сопоставимы с ядрами макрофагов, светлые, содержат одиночное округлое ядрышко, располагающееся центрально. В окрашенных гематоксилин-эозином гистологических срезах отростки фолликулярных дендритических клеток не видны.

При фолликулярной лимфоме фолликулярные дендритические клетки подвергаются гиперплазии, а их отростки образуют плотную сеть. При лимфогранулематозе и СПИДе фолликулярные дендритические клетки, наоборот, разрушаются.

Вторичный фолликул отличается от первичного наличием центра размножения. Его появление отражает процесс пролиферации и дифференцировки В-клеток первичного фолликула, вызванный контактом с Т-зависимыми антигенами. Без фолликулярных дендритических клеток и Т-клеток центр размножения не образуется.

При микроскопии гистологических срезов в центрах размножения видны молодые лимфоидные клетки с рыхлыми светлыми ядрами, с одним или несколькими ядрышками и широкой

цитоплазмой (рис. 4б). В отпечатках им соответствуют клетки типа пролимфоцитов, иммунобластов и лимфобластов. Полагают, что именно в этих клетках происходит гипермутация генов вариабельных участков иммуноглобулинов, пусковым моментом для которой служит стимуляция Т-зависимыми антигенами.

Процесс гипермутации необходим для селекции клона В-клеток, синтезирующего иммуноглобулины с наиболее подходящей структурой антигенсвязывающего участка (высокоаффинные антитела). Выживание отобранного клона обеспечивает антиапоптотический белок Bcl-2. В клонах, синтезирующих низкоаффинные антитела, и поэтому не прошедших отбор (лишних), уровень экспрессии bcl-2 резко снижается. Это приводит клетки к апоптозу (рис. 5) и уничтожению макрофагами, которые распознаются по широкой светлой цитоплазме с остатками поглощенных клеток (см. раздел «макрофаги»). Так происходит первичный иммунный ответ.

Наряду с молодыми лимфоидными клетками в центре размножения присутствуют и более мелкие клетки с темными, почти бесструктурными ядрами – лимфоциты-центроциты. Предположительно они составляют потомство клона, прошедшего отбор в центре размножения. Их ядра часто расщеплены, однако диагностического значения этот признак не имеет, поскольку инвагинации ядерной оболочки есть у всех лимфоцитов (это хорошо видно при электронной микроскопии). В реактивных вторичных фолликулах мелкие и крупные клетки иногда

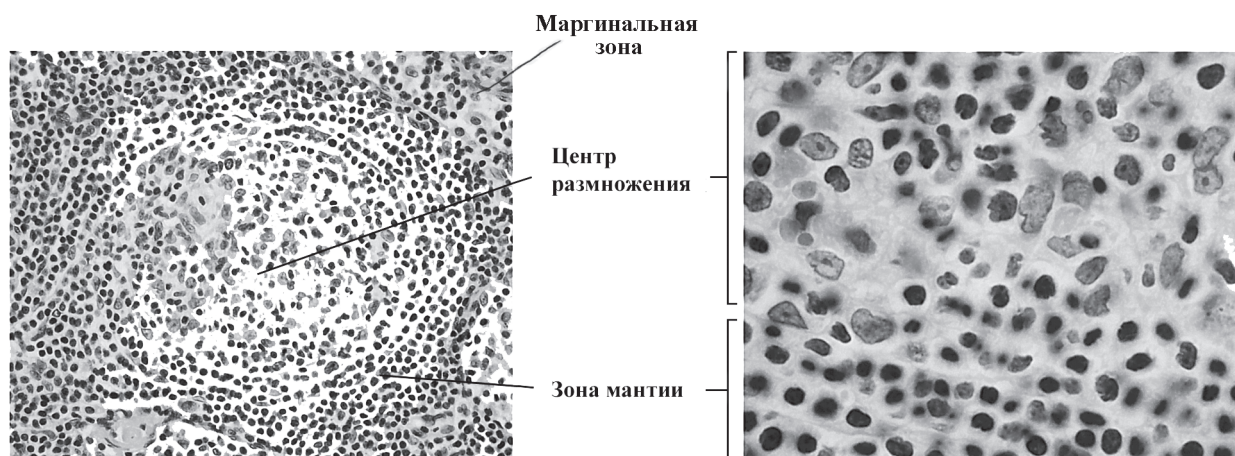


Рис. 4. Вторичный фолликул в реактивном лимфоузле (мал. ув.) (а) и участок фолликула (б. ув.) (б). Видны крупные клетки в центре размножения.

скапливаются у противоположных краев центра размножения, из-за чего последний выглядит поляризованным. В значительной части клеток центра размножения нормального фолликула уровень экспрессии *bcl-2* снижен, уровень делящихся клеток (определяемых маркером Ki-67) высок (рис. 6а, б). Если центр фолликула представлен опухолевыми клетками (например, при фолликулярной лимфоме), поляризация отсутствует и уровень экспрессии *bcl-2* в центре размножения высокий. Пролиферирующие клетки центра размножения оттесняют клетки, прошедшие стадию гипермутации, к периферии, что приводит к образованию мантийной зоны. В гистологическом срезе последняя представлена правильными concentрическими рядами лимфоидных клеток с плотными ядрами, окружающими центр размножения (см. рис. 3, 4а). Морфологически лимфоциты мантийной зоны имеют плотные ядра малых лимфоцитов. Иммунофенотипически и функционально лимфоциты мантийной зоны весьма разнородны. Большая их

часть представляет собой рециркулирующие В-клетки, появляющиеся в ходе первичного иммунного ответа на Т-независимые антигены; их иммунофенотип соответствует иммунофенотипу В-клеток крови и первичных фолликулов. Вторая по численности популяция состоит из долго живущих В-клеток памяти, образующихся в центре размножения в ходе первичного иммунного ответа на Т-зависимые антигены (эти клетки также постоянно рециркулируют). При повторной встрече с тем же антигеном В-клетки памяти мигрируют в костный мозг, где дифференцируются в плазмocyты, секретирующие IgG или IgA. Так осуществляется вторичный иммунный ответ.

Наиболее малочисленную популяцию лимфоцитов мантийной зоны составляют клетки, аналогичные девственному (нестимулированному) В-клеткам костного мозга. Часть из этих клеток экспрессирует Т-клеточный антиген CD5. Последние составляют самостоятельную линию В-клеток. В-клеток CD5+ много в крови у новорож-



Рис. 5. Фигуры апоптоза (указаны стрелкой).

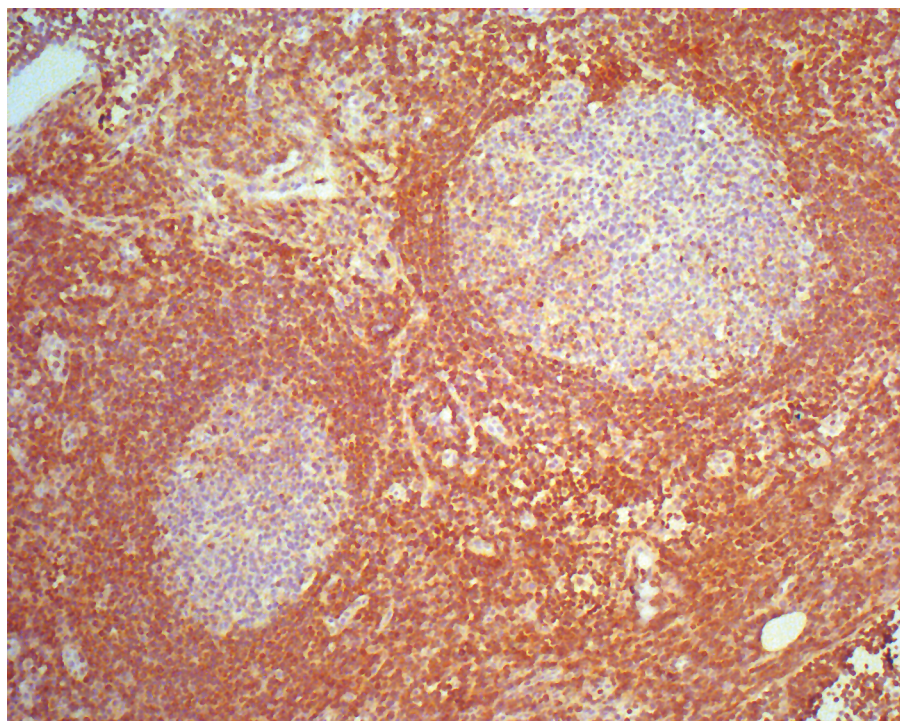
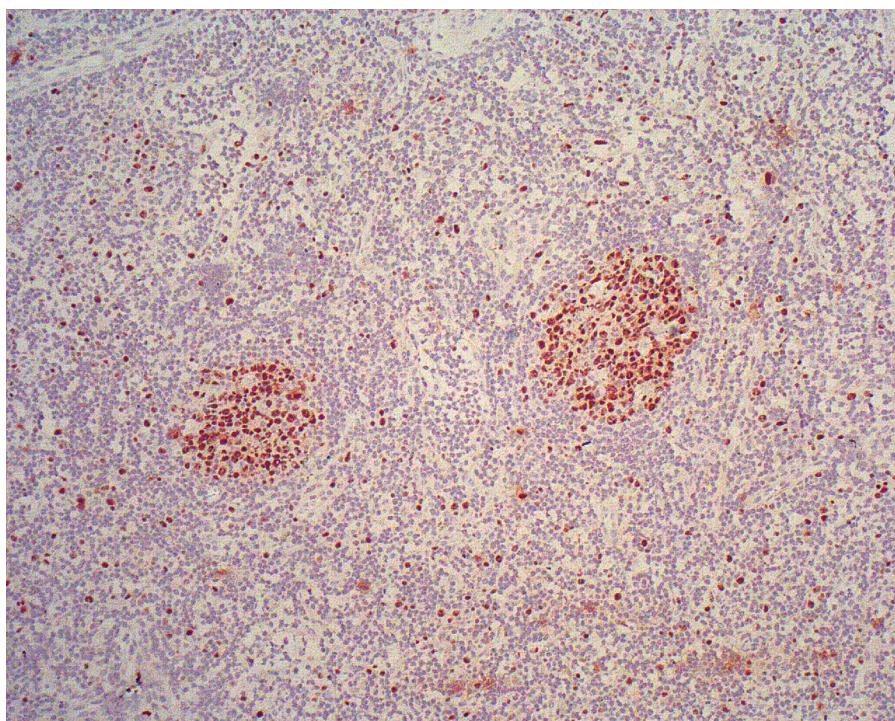
**а****б**

Рис. 6. Иммуногистохимический препарат реактивного лимфоузла. Пероксидазный метод (мал. ув.).

а – экспрессия bcl-2 в клетках зоны мантии; б – экспрессия Ki-67 в ядрах клеток центра фолликула.

денных и лиц, недавно перенесших трансплантацию костного мозга.

Снаружи фолликул окружен бесструктурным лимфоцитарным валом, который представляет собой его краевую – маргинальную зону (см. рис. 3, 4а). На границе между мантийной и марги-

нальной зонами видны беспорядочно расположенные, неплотно прилегающие друг к другу лимфоциты. Строение лимфоцитов маргинальной зоны различно. У многих из них более светлое и более крупное ядро, а также более широкая (по сравнению с клетками мантийной зоны)

цитоплазма. В маргинальной зоне встречаются макрофаги, В- и Т-клетки. Последние довольно многочисленны. В-лимфоциты маргинальной зоны экспрессируют мембранные IgM и рецепторы к IL-2. После стимуляции Т-независимыми антигенами они начинают пролиферировать и там же в маргинальной зоне дифференцируются в плазмциты, продуцирующие IgM. Маргинальная зона без четкой границы переходит в синус (см. рис. 3). В-лимфоциты маргинальной зоны и синуса при реактивных лимфаденитах могут претерпевать такую морфологическую трансформацию, что по размерам и структуре становятся похожими на моноциты.

Паракортикальная зона лимфоузла, или паракортекс, представляет собой зону скопления Т-клеток, которые так же, как и В-клетки корко-

вого слоя, могут образовывать скопления. Провести четкую границу между паракортексом и корковым слоем обычно невозможно. Большая часть клеток, входящих в состав скоплений паракортикальной зоны, представлена Т-клетками CD4+ (Т-хелперами). В их состав входят многочисленные интердигитатные (переплетенные) клетки, субпопуляция дендритических клеток и венулы с высоким эндотелием, через которые осуществляется миграция лимфоцитов.

Пространство между фолликулами лимфоузла и трабекулами занято мигрирующими В-клетками, Т-клетками, макрофагами, а также фибробластами, образующими тончайший соединительнотканый каркас лимфоузла. В центральной, мозговой зоне лимфоузла относительно много плазматических клеток.

СЕЛЕЗЕНКА

Селезенка взрослого человека имеет анатомические размеры примерно 13x8,0 см и массу 180–250 г. Так же, как и лимфоузлы, селезенка со всех сторон окружена соединительнотканной капсулой из пучков коллагеновых волокон, а поверхность образует париетальная брюшина. В области ворот селезенки ее оболочка дает отроги, глубоко проникающие в толщу органа – трабекулы. Паренхима селезенки называется пульпой. Макроскопически на разрезе видна крапчатая структура органа.

В селезенке различают два типа ткани: красную пульпу и белую пульпу. При микроскопии видно, что белая пульпа распределена вдоль центральных артериол, образуя вокруг них периартериоллярные лимфоидные муфты. **Фолликулярная артерия** окружена плотным валом Т-клеток – муфтой, которая иногда через тяж, состоящий из лимфоцитов, соприкасается с В-клеточным фолликулом, имеющим и центр размножения, и мантию (рис. 7). Т-клетки муфт имеют плотное ядро и размеры малых Т-лимфоцитов. При микроскопии среза, прошедшего вдоль артерии, вокруг муфты и лимфатического фолликула имеется зона, где лимфоцитов больше, чем в красной пульпе, но меньше, чем в белой. Эта зона перехода между красной и белой пульпой называется маргинальной. Покидая белую пульпу, фолликулярная артерия делится на несколько артериол-ветвей,

расходящихся в разных направлениях (так называемые кисточковые артерии) (рис. 8). Кисточко-

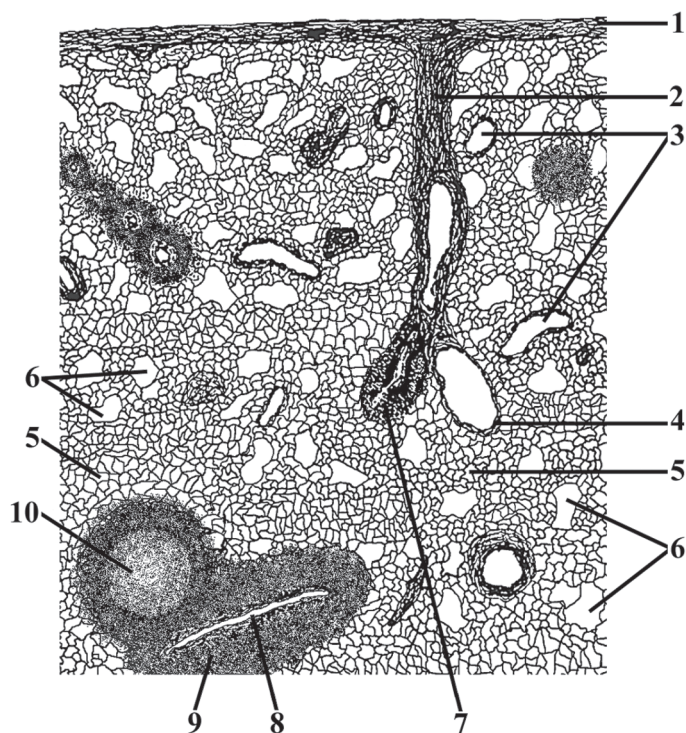


Рис. 7. Схема среза селезенки.

1 – капсула, 2 – трабекула, 3 – вены красной пульпы, 4 – трабекулярная вена, 5 – красная пульпа, 6 – синусоиды красной пульпы, 7 – трабекулярная артерия, 8 – центральная артерия, 9 – периартериальная муфта (Т-лимфоциты), 10 – вторичный фолликул с центром размножения (В-лимфоциты). Периартериальные муфты и фолликулы составляют так называемую белую пульпу (8, 9, 10).

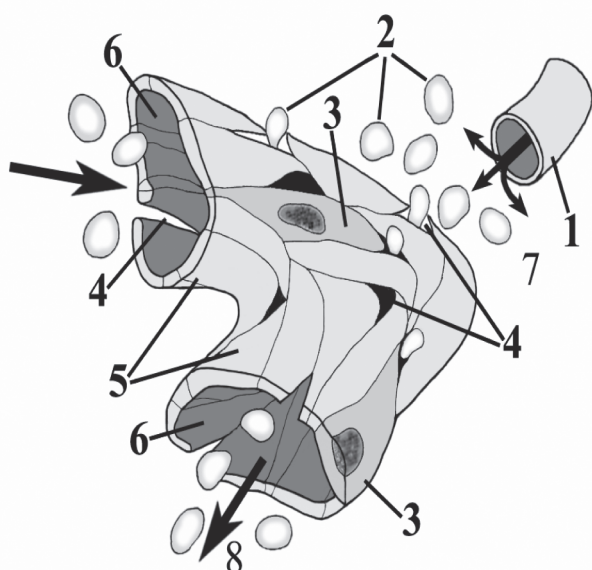


Рис. 8. Схема строения синусоидов красной пульпы.

1 – артериолы, 2 – эритроциты, 3 – макрофаги, 4 – щели селезеночных тяжей, 5 – эндотелиальные клетки синусоидов, 6 – просвет синусоида, 7 – зона открытого кровообращения, 8 – переход синусоида в вену.

вые артерии непосредственно открываются в красную пульпу (в селезенке, как и в лимфоузле, система кровообращения открытая, (см. рис. 8). Основу красной пульпы селезенки составляет сеть ретикулиновых волокон, переходящих в коллагеновые волокна трабекул и капсулы. Ретикулиновая сеть красной пульпы пронизана широкими каналами, переходящими в вены, – синусоидами (см. рис. 8). Между длинными эндотелиальными клетками, выстилающими синусоиды, имеются продольные щели, через которые формен-

ные элементы крови покидают селезенку. Отжившие эритроциты, которые неспособны «протиснуться» через эти щели, фагоцитируются многочисленными макрофагами красной пульпы (рис. 9). Собственно красная пульпа представляет собой скопления в основном эритроцитов, а также макрофагов и лимфоцитов. В отпечатке селезенки среди ее лимфоцитов встречается не так мало довольно крупных форм – раза в полтора больше малого лимфоцита. Эти крупные лимфоциты имеют плотную структуру хроматина, но

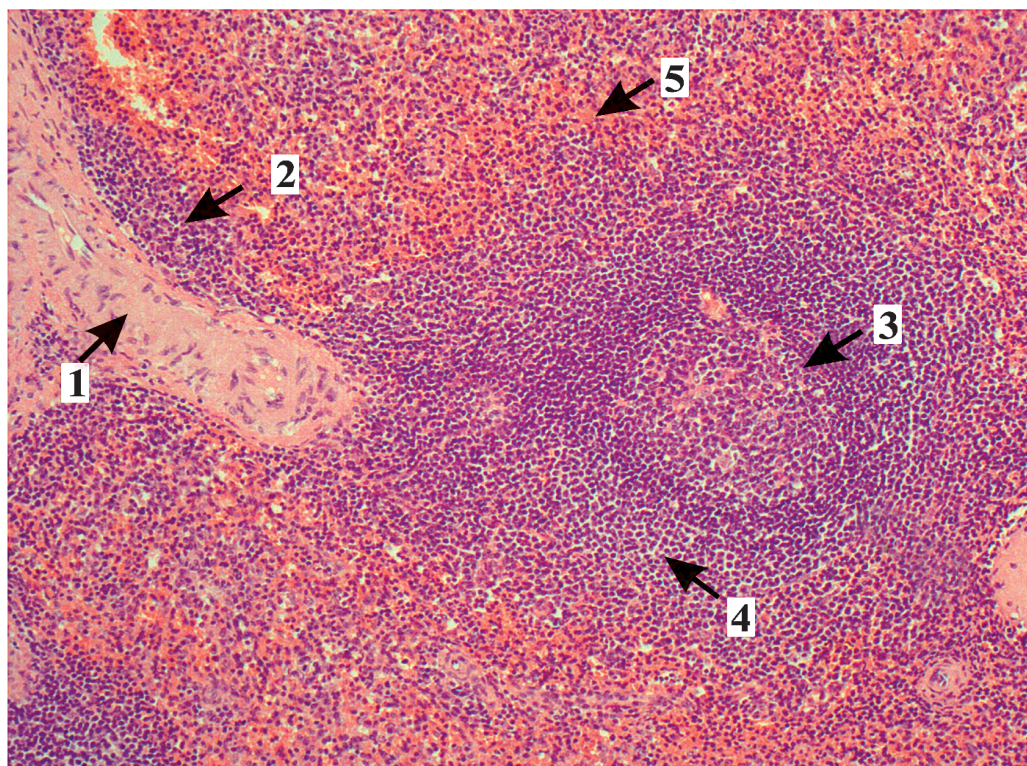


Рис. 9. Гистологический срез реактивной селезенки (мал. ув.).

1 – стенка центральной артерии, 2 – муфта, 3 – фолликул с зародышевым центром и мантией, 4 – маргинальная зона, 5 – красная пульпа.

часто – неправильную форму ядра. Иногда эти клетки называют «спленоцитами» (рис. 10). Кроме того, в отпечатке и мазке из селезенки могут встречаться и плазматические, и тучные клетки. После или на фоне кровопотерь, при различных

реактивных состояниях в отпечатке (мазке) и гистологическом препарате селезенки можно обнаруживать и единичные эритрокариоциты, и мегакариоциты, и молодые клетки гранулоцитарного роста.

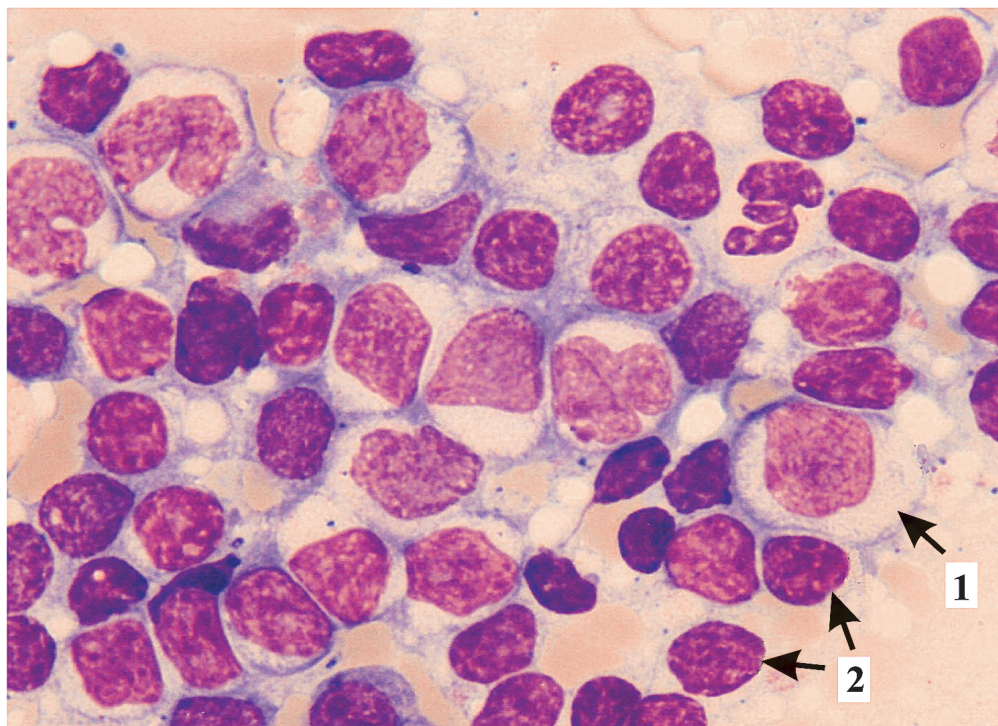


Рис. 10. Отпечаток реактивной селезенки.
1– «спленоцит», 2 – лимфоцит.

НЕИНКАСУЛИРОВАННЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ ОБРАЗОВАНИЯ

Кроме лимфоузлов и селезенки к периферическим лимфоидным органам относится также система неинкапсулированных (т.е. лишенных соединительнотканной оболочки) лимфатических скоплений и фолликулов, рассеянных по рыхлой соединительной ткани желудочно-кишечного тракта, мочевых и дыхательных путей. В этих полых органах лимфатическая ткань представляет собой вторую «линию обороны» организма от антигенов. Она связана с эпителием слизистых оболочек, что особенно хорошо видно в лимфатической ткани глоточного кольца (миндалины). Эта связь послужила поводом к появлению термина «мукозоассоциированная ткань слизистых оболочек» или MALT-система. Ни гистогенетически, ни функционально эти скопления лимфоцитов не являются похожими друг на друга. Возникающие в них лимфатические опухоли также весьма различны.

Большинство неинкапсулированных лимфатических образований в рыхлой соединительной ткани располагается обособленно. В миндалинах они образуют подобие лимфоузла, ок-

руженного многослойным неороговевающим эпителием (рис. 11). В подвздошной кишке скопления лимфатических фолликулов представлены видимыми невооруженным глазом структурами – пейеровыми бляшками. Форма изолированного фолликула приближается к сферической, а размеры достигают 1,0 мм. На срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, при малом увеличении изолированный фолликул выглядит как темное округлое образование (рис. 12). При большем увеличении видно, что он сформирован тесно прилегающими друг к другу малыми лимфоцитами с плотным ядром и узким ободком цитоплазмы. Иногда в нем виден центр размножения, похожий на центры размножения вторичных фолликулов лимфоузлов. Границы фолликулов нечеткие, поскольку концентрация лимфоцитов по мере перемещения в сторону прилежащей ткани уменьшается. Лимфоциты фолликулов способны дифференцироваться в плазмциты, которые хорошо видны при микроскопии в виде разрозненно лежащих элементов. Иногда встречаются дос-

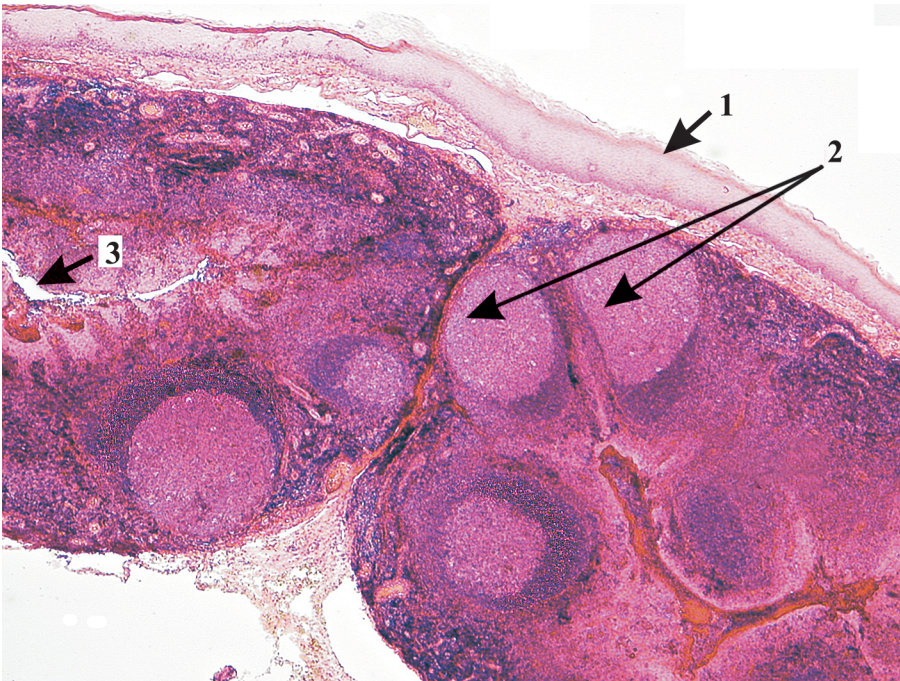


Рис. 11. Гистологический срез миндалины (мал. ув.).

1 – многослойный плоский неороговевающий эпителий, 2 – скопления лимфоидных фолликулов, 3 – крипта.

таточно большие скопления плазматических клеток, обычно с той или иной примесью лимфоцитов.

Следует отметить, что единичные лимфоциты встречаются в собственной пластинке (*lamina propria*) слизистой полых органов практически на всем ее протяжении. Иногда эти лимфоциты лежат мелкими группами.

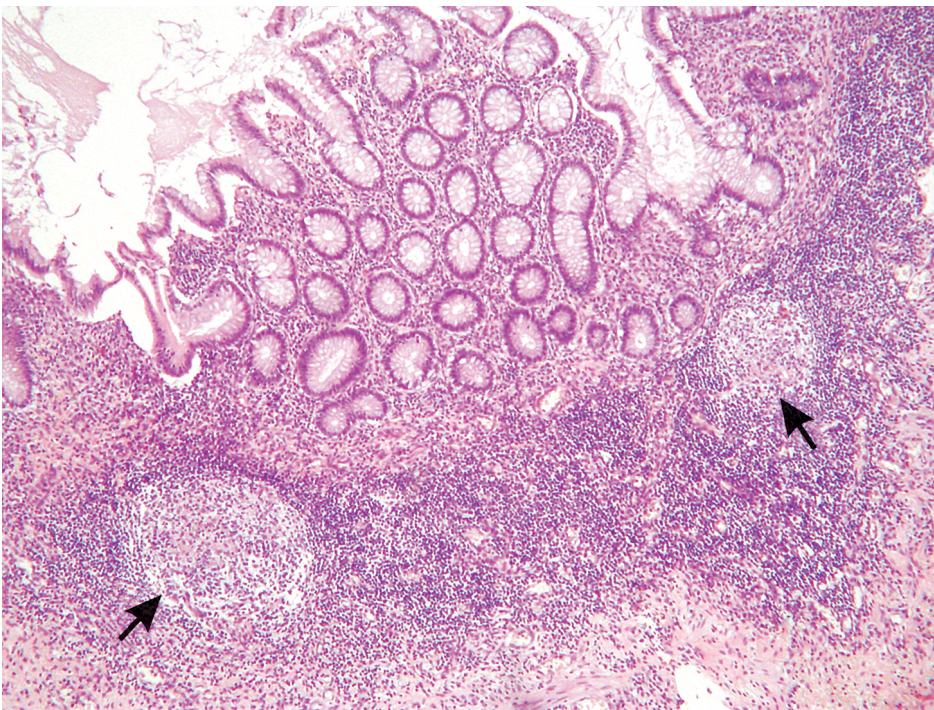


Рис. 12. Пейерова бляшка в подслизистом слое толстой кишки (указаны стрелкой) (мал. ув.).

ТИМУС

Тимус является первичным лимфоидным органом, большая часть которого находится за грудиной. Форма тимуса, вероятно, напоминала древним анатомам лист тимьяна (thyme), откуда и произошло его название. У человека тимус представляет собой единую структуру, состоящую из двух долей. Размер тимуса существенно меняется с возрастом. Наибольший его размер относительно размера всего тела отмечается у плода и в первые два года жизни. После наступления половой зрелости начинается инволюция органа.

Обе доли тимуса окружены соединительнотканной капсулой, которая посылает отростки в вещество каждой доли, образуя перегородки – септы (рис. 13а). Последние делят каждую долю на дольки размерами 1–2 мм. В центральной части долек ткань тимуса непрерывна, следовательно, хотя септы и внедряются глубоко в долю, пронизывают они ее неполностью. Однако, если срез через дольку прошел параллельно поверхности, она может выглядеть как полностью окруженная септами. При инволюции тимуса в септах накапливаются жировые клетки. Строма тимуса образована эпителиальными клетками, отростки которых, соединяясь,

образуют сеть. Промежутки между эпителиальными клетками и их выростами заполнены Т-клетками разных этапов дифференцировки. В молодом возрасте тимус является местом непрерывного и активного размножения лимфоцитов. Однако размножение Т-клеток в тимусе, в отличие от процесса образования В-клеток в периферических органах лимфатической системы, от антигенной стимуляции не зависит. Поэтому лимфа через тимус не проходит.

Т-клетки тимуса называются тимоцитами. Тимоциты имеют тенденцию концентрироваться вдоль границ, примыкающих к капсуле или септе, разделяющей дольки. Периферическую часть дольки называют корковым веществом, а ее бледно окрашенную центральную часть, не содержащую такого большого числа клеток, – мозговым (см. рис. 13а). В наружной части коркового вещества, где проходят наиболее ранние этапы созревания тимоцитов, клетки крупные, имеют светлые ядра. В них встречаются митозы. Чем ближе лимфоциты к мозговому веществу, тем мельче клетки и тем меньше в них митозов. Границу мозгового и коркового вещества занимают тимоциты наиболее поздних этапов дифференцировки (мелкие

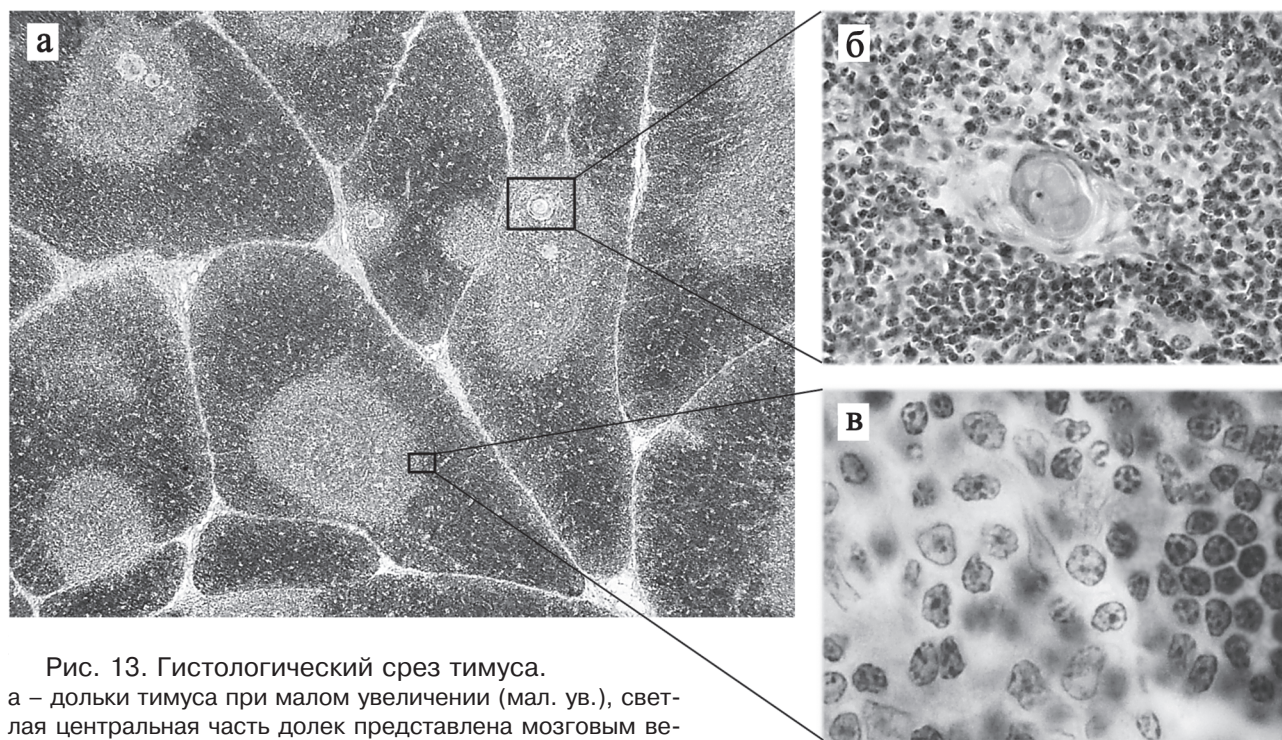


Рис. 13. Гистологический срез тимуса.
а – дольки тимуса при малом увеличении (мал. ув.), светлая центральная часть долек представлена мозговым веществом, темная периферическая – корковым, светлые линии между дольками – септы; б – тельце Гассалья в мозговом веществе (мал. ув.); в – граница между корковым (справа) и мозговым (слева) веществом дольки (имм.).

клетки с плотным ядром и узкой цитоплазмой) (рис. 13в). Мозговое вещество долек содержит тельца Гассала – шаровидные скопления эпителиальных клеток, которые позволяют легко идентифицировать описываемый орган на гистологическом срезе (рис. 13б).

Кроме тимоцитов и эпителиальных клеток в тимусе имеется субпопуляция дендритических клеток, а также макрофаги. Последних особенно много на границе коркового и мозгового вещества долек, где наиболее активен процесс негательной селекции тимоцитов.

На границе коркового и мозгового вещества располагаются артериолы. Отходящие от артериол капилляры проникают в корковое вещество, где они формируют анастомозирующие друг с другом капиллярные аркады. От них капилляры возвращаются к границе двух зон тимуса, впа-

дая там в посткапиллярные венулы мозгового вещества.

Образовавшиеся зрелые тимоциты покидают тимус из внутренней части коркового вещества, минуя мозговое. От мозгового вещества тимуса кровь оттекает по венам, связанным с периваскулярной соединительной тканью. Имеется также некоторое количество лимфатических сосудов, выносящих лимфу по мере ее образования.

Отпечаток тимуса представлен почти исключительно зрелыми малыми лимфоцитами (рис. 14). Структура их ядер несколько необычна, так как хроматин имеет некоторую своеобразную гранулированность, которая может напоминать ядра молодых опухолевых клеток. Однако все клетки такого отпечатка однотипны и однородны. Клеток с бластной структурой ядер нет.

КОСТНЫЙ МОЗГ

В антенатальном периоде кроветворение осуществляется в нескольких органах: печени, селезенке и костном мозге. В постнатальном периоде кроветворная ткань сохраняется только в костных полостях губчатых костей.

Изучение костного мозга является обязательным элементом обследования любого больного с подозрением на опухоль лимфатической системы. Костный мозг необходимо исследовать и в цитологическом, и в гистологическом препаратах. Цитологический анализ необходим для изучения деталей клеточной морфологии, не видимых в гистологическом срезе. В свою очередь, гистологический препарат позволяет оценить соотношение между жировой тканью и полиморфным (деятельным) костным мозгом (рис. 14), определить объем поражения и типы роста опухоли: диффузный, очаговый, очагово-интерстициальный.

Кроветворная ткань взрослого человека заключена в костный матрикс и состоит из двух основных компонентов: стромы и кроветворных клеток. Строма костного мозга представляет собой трехмерную сеть клеток и волокон соединительной ткани (ретикулиновых и коллагеновых). Коллагеновые волокна образуются фибробластами. Они поддерживают сосудистую сеть костного мозга и служат опорой для кроветворных клеток. В гистологических срезах фибробласты выглядят как элементы с темными бесструктурными веретенообразными или овальными ядрами. Цитоплазма у фибробластов – узкие нити. Иногда на срезах костного мозга видны так называемые ретикулярные

клетки – крупные неправильной формы элементы с бледной цитоплазмой и слабоокрашенными ядрами. Название «ретикулярный» является сугубо описательным и ничего не говорит о происхождении и функции этих клеток. В цитологических препаратах фибробласты не идентифицируются.

К другим типам клеток, составляющих строму костного мозга, относятся макрофаги, эндотелиальные и жировые клетки. Поскольку при обезвоживании трепанобиоптатов жир вымывается, жировые клетки в гистологических срезах как таковые не видны (они выглядят как разбросанные по миелоидной ткани округлые пустоты) (см. рис. 14). Макрофаги легко распознать по широкой светлой цитоплазме, содержащей остатки фагоцитированных частиц, ядро, как правило, круглой или овальной формы, с гранулярной структурой хроматина, одной небольшой голубой нуклеолой. Макрофаги бывают и с двумя такими ядрами. Эндотелиальные клетки образуют выстилку синусоидов – широких тонкостенных сосудов, через стенки которых созревшие кроветворные клетки покидают костный мозг. *В гистологических препаратах эндотелиальные клетки выглядят крупными элементами со светлым ядром и широкой вытянутой цитоплазмой. Иногда они образуют структуры сосудистой стенки.*

В качественно приготовленных гистологических срезах костного мозга хорошо видны и некоторые элементы кроветворной ткани. Среди них обычно выделяются мегакариоциты – гигантские клетки с лопастными ядрами (см. рис. 14).

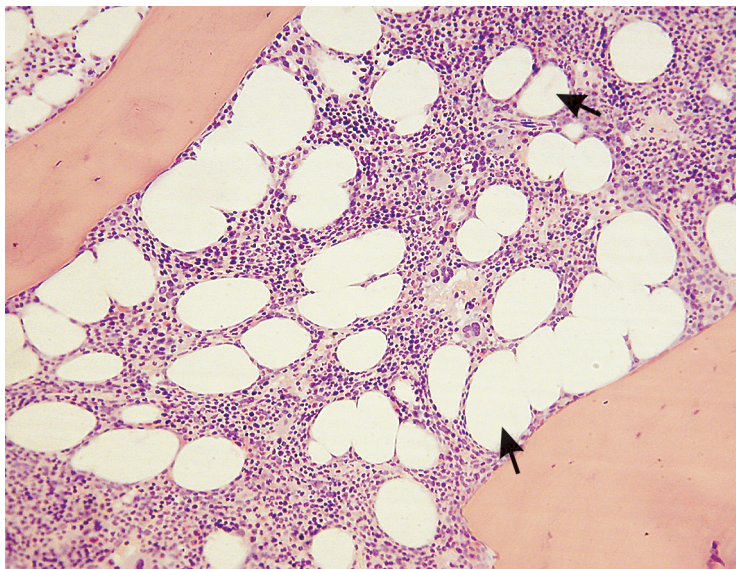


Рис. 14. Трепанобиоптат костного мозга (мал. ув.). Нормальное соотношение деятельного костного мозга и жира. Стрелкой указаны пустоты на месте жировых клеток.

Рис. 15. Эритробластический островок в трепанате костного мозга (б. ув.) (указан стрелкой).

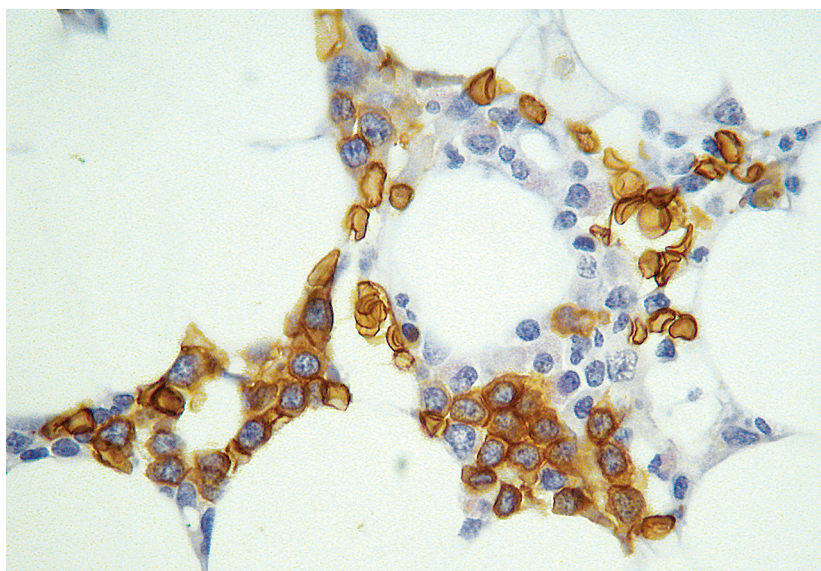
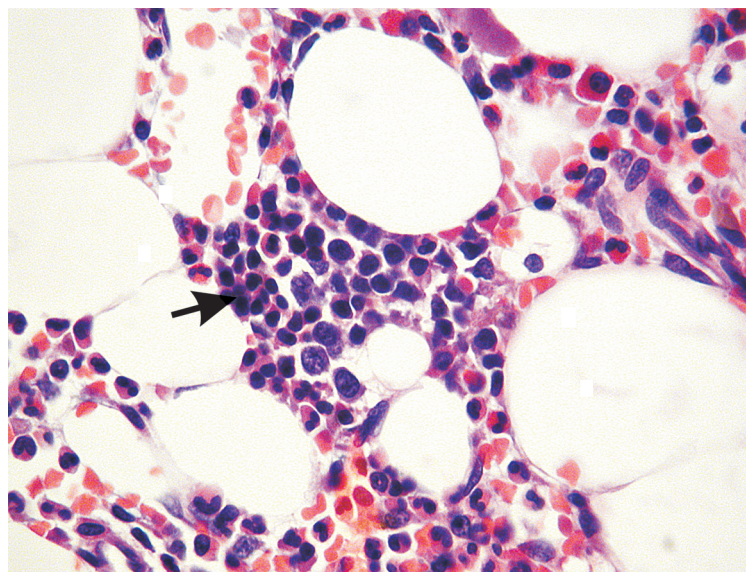


Рис. 16. Иммуногистохимический препарат трепаната костного мозга. Окраска на гликофорин А, пероксидазный метод (б. ув.). Окрашены мембрана, цитоплазма ядросодержащих эритроидных клеток и эритроциты.

Мегакариоциты часто образуют скопления по 3–4 клетки. Зрелые гранулоциты легко узнать по характерной форме ядер (палочки и сегменты). Наличие крупных оранжевых зерен, полностью заполняющих цитоплазму, позволяет отличать эозинофильные гранулоциты от нейтрофильных. Широкая, интенсивно окрашенная цитоплазма и плотные, эксцентрично расположенные ядра характерны для плазмочитов.

Попытки сосчитать миелограмму по гистологическим препаратам всегда приводили к ошибкам, так как формалин сморщивает клетки, а их дифференциация рассчитана на распластывание по поверхности стекла. Наибольшие трудности обычно возникают при попытке дифференцировать клетки эритроидного ростка (эрит-

рокариоциты) от нормальных элементов лимфатического ряда. Определенную помощь могут оказать особенности строения ядра этих клеток и их взаимного расположения. Эритрокариоциты на гистологических срезах костного мозга обычно лежат группами из нескольких клеток. Часть из них имеет мелкие, почти черного цвета ядра. Лимфоидные скопления в нормальном костном мозге встречаются редко. Ядра лимфоцитов в гистологических срезах костного мозга немного крупнее, чем у эритрокариоцитов, окрашены менее интенсивно. Надежно отличить лимфоидные скопления от эритроидных можно с помощью иммуногистохимического исследования: эритроидные клетки окрашиваются гликофорином (рис. 16).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЛИМФОЦИТОВ

В современных международных классификациях новообразований лимфатической системы нозологические формы соотносятся с уровнем дифференцировки лимфоцитов соответствующей клеточной линии (В-, Т- или NK-). Тем самым предполагается, что у каждой лимфатической опухоли в иммунной системе здоровых лиц имеется предполагаемый нормальный предшественник – клетка, которая стала источником опухолевого роста. Лимфоциты развиваются из стволовых клеток костного мозга, образующих при дифференцировке общий предшественник лимфопоэза, затем предшественники В- и Т-лимфопоэза. Дальнейшая дифференцировка и созревание В-лимфоцитов на ранних этапах происходит в структурах костного мозга, а предшественники Т-лимфоцитов мигрируют в тимус, где происходит их дальнейшая дифференцировка в Т-клетки с различными функциями и в том числе в NK-клетки (натуральные киллеры). Основными функционально разнородными группами лимфоцитов, участвующими в осуществлении ответа на антиген, являются Т- и В-лимфоциты. Дифференцировка В-лимфоцитов отличается от дифференцировки Т-лимфоцитов наличием этапа гипермутации, происходящей после встречи с антигеном. Подготовка лимфоцитов к контакту с антигеном начинается уже на стадии антигеннезависимой дифференцировки, хотя она основана на случайной комбинации генных сегментов и последующем отборе клонов. В результате реакции между антигеном и антиген-распознающей структурой клетка активируется и приобретает способность к пролиферации. После встречи с антигеном происходит отбор более узко специфичных к антигену

лимфоцитов, которые способны распознавать только один антиген из огромного множества, образуя клон клеток памяти. В организме в состоянии «полной готовности» находится более 10^8 Т-клеток и более 10^{10} В-клеток. Разнообразие их обеспечивается рекомбинацией генов иммуноглобулинов в В-клетках, и генов Т-клеточного рецептора в Т-клетках.

Для дифференцировки предшественников лимфоцитов необходима тесная кооперация многих клеток. Условия для такой кооперации существуют в костном мозге и тимусе. Окончательное созревание происходит в периферических органах иммунной системы: лимфоузлах, селезенке, лимфоидных системах слизистых оболочек.

Стадии дифференцировки и соответствующие этим стадиям особенности иммунофенотипа лимфоцитов представлены на рис. 17 и 18

В-клетки

Ранние стадии дифференцировки В-лимфоцитов (антигеннезависимые) проходят в костном мозге. Она завершается образованием «наивных» В-лимфоцитов, которые несут молекулы иммуноглобулинов М, D, CD19, CD22 и CD23. Зрелые В-лимфоциты несут на поверхности иммуноглобулиновые молекулы, связанные с двумя дополнительными цепями – альфа и бета, в комплексе представляющие антиген-распознающий рецептор, способный узнавать антиген. Кроме того, В-лимфоциты несут рецептор для Fc фрагмента иммуноглобулина G и рецепторы для ряда компонентов комплемента CD21 и CD35. В-лимфоциты могут представлять антиген и вырабатывать антитела к нему.

Дифференцировка и созревание В-лимфоцитов происходит постоянно в течение всей жизни организма. Т-лимфоциты стимулируют ранние этапы дифференцировки В-лимфоцитов с помощью интерлейкинов 2 и 7, а также стимулируют пролиферацию зрелых В-лимфоцитов с помо-

щью вырабатываемых Т-хелперами интерлейкинов 2,4,5 и 6. Существуют два типа В-клеточного иммунного ответа: Т-зависимый и Т-независимый. При Т-зависимом типе антиген распознается иммуноглобулиновым рецептором (молекулами IgM на поверхности В-клеток), после

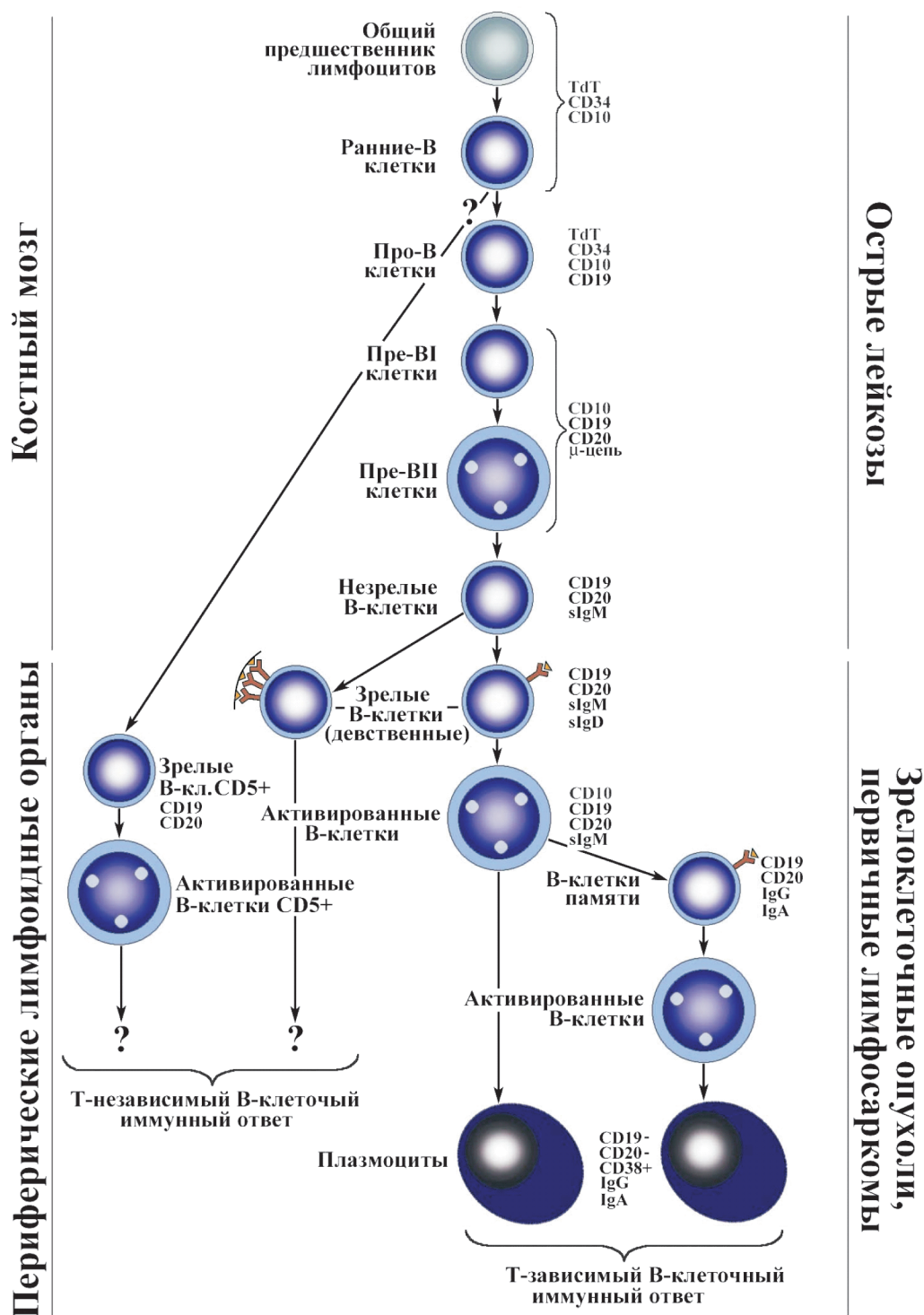


Рис. 17. Схема дифференцировки В-лимфоцитов.

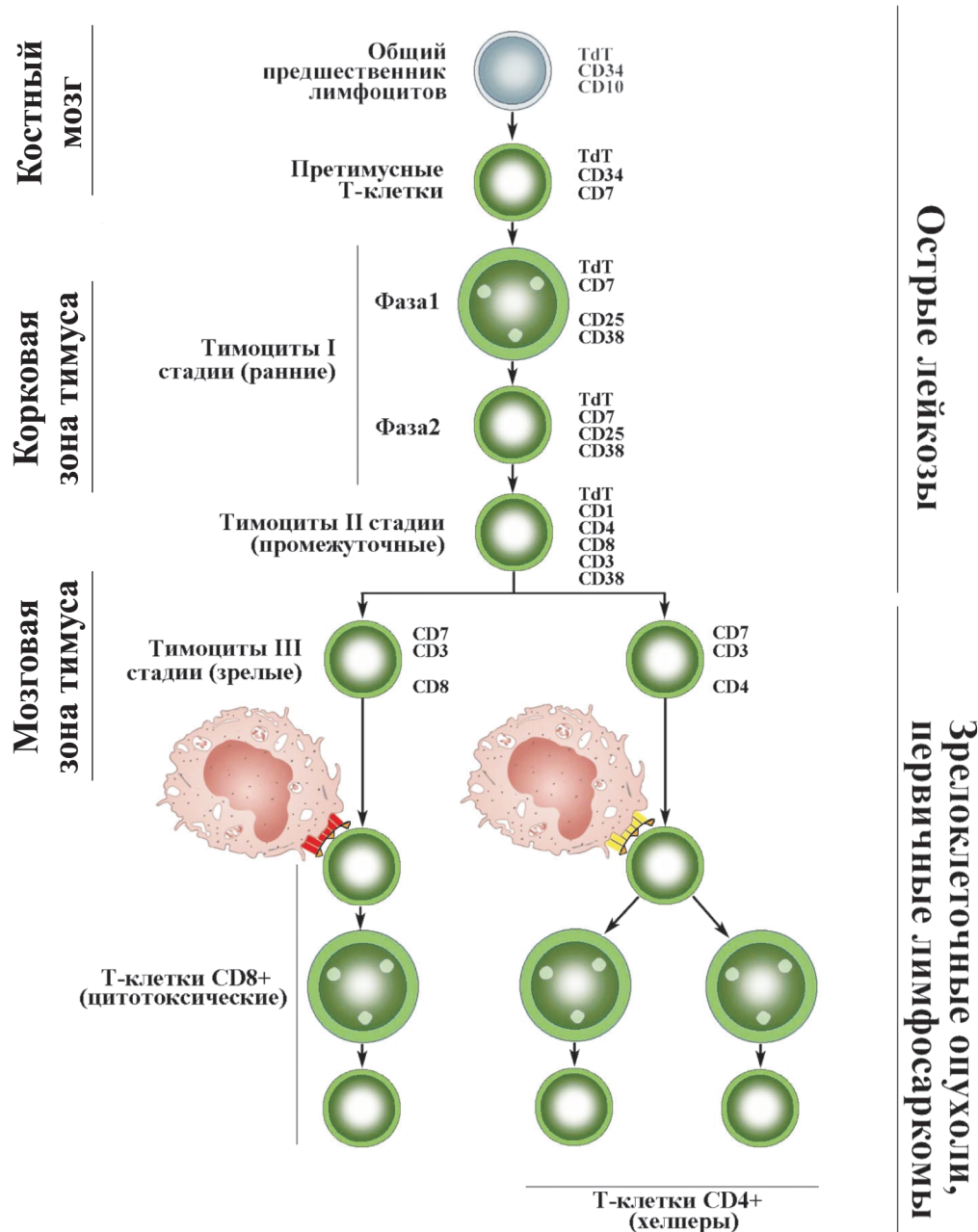


Рис. 18. Схема дифференцировки Т-лимфоцитов.

чего происходит его поглощение и частичное расщепление (процессинг) протеолитическими ферментами фаголизосом. По завершении процессинга фрагменты антигена реэкспрессируются на поверхности лимфоцита в составе молекул главного комплекса гистосовместимости II типа. В таком виде антиген представляется Т-клеткам CD4+ (Т-хелперам), которые продуцируют цитокины, запускающие процесс дифференцировки В-клеток. Дальнейшие события, происходящие в ходе В-клеточного иммунного ответа на Т-зависимые антигены, описаны в разделе «Лимфоузлы».

Т-независимый ответ В-лимфоцитов может быть вызван антигенами, которые имеют в своем составе длинные цепи из повторяющихся молекулярных структур (например, полисахариды). Благодаря такому строению Т-независимые антигены способны связываться не с одним, а сразу с несколькими рецепторами на мембране В-клеток. Т-независимый иммунный ответ не вызывает в В-клетках процесса соматической гипермутации, и, соответственно, проходит без образования вторичного фолликула. Из-за этого иммунный ответ на Т-независимые антигены малоспецифичен и нестойк.

Среди В-лимфоцитов различают популяции В1 и В2. Более рано возникающая в онтогенезе В1-популяция В-лимфоцитов имеет на мембране CD5 маркер, свойственный большинству Т-лимфоцитов и имеет отношение к выработке натуральных (естественных) антител, отличающихся полиспецифичностью, и аутоантител. Популяция В2-лимфоцитов отделяется на ранних этапах развития, является наиболее многочисленной популяцией В-лимфоцитов, способной к дифференцировке в плазматические клетки и выработке высоко аффинных антител после встречи с чужеродным антигеном.

Т-клетки

Дифференцировка Т-лимфоцитов включает два этапа: первый проходит в костном мозге, сопровождается появлением общего лимфоидного предшественника, затем общего Т-клеточного предшественника, который мигрирует в корковую область тимуса, образуя ранние тимоциты. Тимоциты на ранних этапах активно пролиферируют, дифференцируются и подвергаются негативной селекции и апоптозу, которые направлены на удаление клеток, способных реагировать на собственные антигены организма (аутоантигены). Тимоциты, которые не подверглись селекции и апоптозу созревают, пройдя несколько стадий дифференцировки, из которых особенно важными являются первые, когда от общей клетки-предшественницы отделяются натуральные (естественные) киллеры – NK-клетки, имеющие свой дальнейший путь созревания. Затем на уровне ранних дубль отрицательных (не имеющих маркеров CD4 и CD8) тимоцитов, имеющих цитоплазматические структуры для образования Т-клеточного рецептора гамма-дельта, у части клеток происходит перестройка генов, приводящая к дифференцировке отдельного направления Т-клеток с Т-клеточным рецептором альфа-бета, приводящая к пролиферации и созреванию наиболее многочисленной популяции многофункциональных Т-клеток.

Т-клеточный антигенраспознающий рецептор состоит из α и β -цепей, которые кодируются генными сегментами $V\alpha$, $J\alpha$ и $C\alpha$, находящимися в 14-й хромосоме, и генными сегментами $V\beta$, $D\beta$, $J\beta$ и $C\beta$, которые локализованы в 7-й хромосоме. Т-клеточный антигенраспознающий рецептор гамма-дельта также имеет локусы в 7 хромосоме, которые состоят из трех генных сегментов $V\gamma$, $J\gamma$ и $C\gamma$. Дельта цепи кодируются генными сегментами $V\delta$, $D\delta$, $J\delta$ и $C\delta$, расположенными в 14-й хромосоме между генными сегментами β -цепей. Образующие Т-клеточный рецеп-

тор цепи соединяются с комплексом молекул, образующих структуру CD3, и встраиваются в мембрану Т-клеток. На Т-клетках с Т-рецептором, состоящим из α и β -цепей, в дальнейшем появляются дополнительные иммуноглобулин-подобные структуры – CD4 и CD8, что приводит к образованию наиболее многочисленных субпопуляций: Т-хелперов и Т-супрессоров/киллеров.

После созревания в тимусе Т-хелперы и Т-супрессоры/киллеры мигрируют в лимфатический проток, затем в кровь, и никогда не возвращающиеся обратно в тимус. Т-клетки расселяются в подслизистых и подкожных слоях, Т-зонах лимфатических узлов, в селезенке, образуя подсистемы, состоящие из долгоживущих Т-клеток, активирующихся при встрече с соответствующим антигеном. Часть Т-клеток (около 2% Т-лимфоцитов) постоянно циркулирует в кровотоке. Т-лимфоциты с рецептором гамма-дельта и NK-клетки мигрируют из тимуса в подслизистые слои и вторичные лимфоидные органы в эмбриональном периоде и возможно раннем детском возрасте. Среди них особенно много долгоживущих клонов. Большинство Т-лимфоцитов дифференцируется и созревает в детском возрасте и представляют собой клетки памяти.

Антигены, на которые реагируют Т-клетки, делятся на экзогенные и эндогенные. Экзогенные антигены, поступающие в организм через слизистые, реагируют с клетками, осуществляющими первую барьерную функцию в подслизистых слоях. Среди клеток, вступающих в реакцию с чужеродным антигеном на первом этапе, основными являются макрофаги, дендритные клетки и Т-клетки. Активированные антигеном клетки отвечают на раздражение с помощью секреции цитокинов, привлекающих другие клетки в очаг воспалительной реакции. Часть Т-клеток и дендритных клеток (клетки Лангерганса) мигрирует во вторичные лимфоидные органы, прежде всего в региональные лимфатические узлы. В лимфатических узлах в Т-зависимых зонах активированные Т-клетки делятся, давая потомство (клон) Т-клеток-хелперов, стимулирующих В-лимфоциты к делению и выработке специфических антител. Дендритные антигенпрезентирующие клетки переваривают антиген, и затем его части (обычно пептиды) представляют в составе молекул комплекса гистосовместимости, активируя как Т-, так и В-лимфоциты лимфатического узла. В лимфатическом узле они образуют сеть из интердигитирующих дендритных клеток.

Т-хелперы (CD4+) и Т-киллеры (CD8+) распознают антигены по-разному. Т-хелперы рас-

познают только те пептидные антигены, которые представлены в составе молекул главного комплекса гистосовместимости II класса, а Т-киллеры узнают антигены, встроенные в молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости. Молекулы главного комплекса гистосовместимости I типа экспрессируются всеми ядросодержащими клетками. Это означает, что любая клетка макроорганизма, инфицированная вирусами или другими внутриклеточными патогенами, может быть уничтожена цитотоксическими (киллерными) Т-клетками. В отличие от последних, Т-хелперы действуют опосредованно (через выработку цитокинов, которые активируют многие клетки микроокружения).

Часть Т-лимфоцитов, которая несет антиген-распознающие рецепторы, состоящие цепей гамма и дельта, представлена в подслизистых областях и селезенке в значительно большем объеме, чем в периферической крови, и в отличие от других Т-клеток взаимодействует с целой молекулой антигена, как и дендритная клетка. Предполагается особая роль этих клеток при таких инфекциях, как туберкулез.

НК-клетки (натуральные киллеры)

В отличие от остальных лимфоцитов, НК-клетки несут особый иммуноглобулин-подобный рецептор, обозначаемый как TCR Vbeta8 (или KIR2DS2, или CD158), реагирующий на особый подкласс комплекса гистосовместимости G.

Общими мембранными антигенами на ранних этапах развития Т- и НК-клеток являются CD2 и

CD7. На ранних этапах дифференцировки натуральные киллеры отделяются от общего предшественника лимфопоэза и не приобретают в дальнейшем CD3 маркер, хотя в цитоплазме НК-клеток обнаруживается особая цепь – CD3-эпсилон. На НК-клетках имеется рецептор для константной части иммуноглобулина G (Fcγ) – CD16. НК-клетки имеют тропизм к покровным тканям. В кровотоке они составляют 5–10%, а в лимфатических узлах их мало. Возможно, поэтому редки случаи острого лейкоза с характеристиками НК. Часть НК-клеток приобретают CD56 (молекула адгезии), небольшая часть НК-клеток приобретает CD8. Этапы дифференцировки НК-клеток в настоящее время изучаются. Маркером более ранних стадий считается киллерный лектин-подобный рецептор, имеющий CD941A транскрипт, через который оказывает воздействие интерлейкин-15, влияющий на созревание.

Для НК-клеток характерно наличие в цитоплазме азурофильных гранул и активных ферментов – перфорины и гранзима, количество которых значительно возрастает при активации и которые способствуют проявлению цитотоксического эффекта. Киллерный (цитотоксический) эффект НК-клеток особенно четко выражен в отношении клеток, у которых изменен или утрачен 1 класс главного комплекса гистосовместимости под влиянием вирусной инфекции или опухолевой трансформации. Антителозависимая цитотоксичность НК-клеток направлена на клетки-мишени, покрытые иммуноглобулином G.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ЛИМФАТИЧЕСКОГО РЯДА

Различным опухолям лимфатической системы свойственны разные характеристики составляющих их клеток, которые, будучи лишенными видимых ядрышек, имея рыхлую или плотную структуру хроматина ядра (не бластную!), все объединены общим названием «лимфоцит». Среди них встречаются формы с широкой и узкой цитоплазмой, с зернистостью и без нее, с грубым глыбчатым или гомогенным бесструктурным ядром и т. п. Любые перечисленные морфологические особенности лимфоцитов могут иметь диагностическое значение.

Применительно ко многим кроветворным клеткам десятилетия исследований не внесли каких-либо существенных дополнений к стадиям их дифференцировки. Но лимфоцитарный ряд подвергся коренному пересмотру: стадии дифференцировки лимфоцитов непрерывно

уточняются, не говоря уже о том, что произошло их принципиальное разделение на самостоятельные клеточные линии (В-, Т- и НК-клеток). Каждая из этих линий, в свою очередь, состоит из лимфоцитов антигензависимой и антигеннезависимой стадий дифференцировки (соответственно «иммунологически зрелых» и «иммунологически незрелых»). Благодаря достижениям иммунологии и молекулярной биологии возникло ощущение, что анализ функциональных и иммунофенотипических особенностей лимфоцитов важнее анализа морфологии. Однако микроскоп, как и прежде, является главнейшим инструментом первичного распознавания клеток, определения их принадлежности к какому-либо классу нормальных или патологических элементов, а соответственно и принадлежности к конкретным опухолям лимфатической системы.

Иммунофенотипирование, равно как и цитогенетический и молекулярно-генетический анализ, выявляет те особенности клеток и соответствующих им опухолей, которые обычные цитология и гистология выявить не могут.

Прежде чем давать цитологическую характеристику разнообразным клеткам лимфоцитарного ряда, попытаемся описать перечень признаков, которые будут предметом анализа. Речь пойдет о клетках в цитологических препаратах – мазке или отпечатке, зафиксированных метанолом и окрашенных по Романовскому-Гимза.

Клетки крови анализируют и описывают только в тонком месте мазка, где эритроциты лежат отдельно друг от друга, не накладываясь и не образуя скоплений или «монетных столбиков» (рис. 19). Поскольку клеточные элементы в мазке неизбежно деформируются, то структура клеток в мазке всегда является артефактом. Однако в тонком месте мазка этот артефакт закономерен, а в толстом – нет (в толстом месте степень этой деформации непредсказуема, что вносит дополнительное разнообразие в структуру клеток). Кроме того, в тонком месте мазка клетки распластываются. Это приводит к значительному увеличению их площади, тем самым создается возможность для детального анализа.

Итак, в перечень признаков, которые подлежат анализу при описании лимфоцитарных элементов, следует внести следующие:

1. Форма клеток (цитоплазмы), цвет цитоплазмы, наличие или отсутствие просветления цитоплазмы вокруг ядра (перинуклеарное просветление), наличие или отсутствие отрост-

ков цитоплазмы (феномен «волосатости»), наличие или отсутствие зернистости в цитоплазме, величина зерен, их цвет; наличие вакуолизации и «плазматизации», т. е. выраженного фиолетового оттенка цитоплазмы.

2. Форма ядер. У мелких клеток ядра округлые, у крупных клеток они могут быть округлыми, овальными или неправильной формы – с выростами, неровным контуром, полигональные и т. п.
3. Структура хроматина:
 - а) нитчатая, с равномерностью окраски и калибра нитей (бласты),
 - б) гранулярная, наподобие своеобразной «шагреновости» мегалобластов,
 - в) грубоглыбчатая, напоминающая рисунок «гор и долин» физической карты,
 - г) светлый, «гладкий» хроматин, образующий рыхлую бесструктурную массу, в которой нередко можно видеть закономерные одинакового размера просветления – области ядрышек, – и «трещины».
4. Отдельного описания заслуживают ядрышки. От случайных просветлений в хроматине ядра ядрышко, как правило, отличается окружающим его плотным хроматиновым венчиком. В нормальных клетках ядрышек 1–2, располагаются они в центре ядра или слегка эксцентрично. Ядрышки обычно круглые или слегка овальные, примерно одинакового размера, голубые. В опухолевых клетках ядрышки выделяются рядом особенностей: их форма часто неправильная, даже в одном и то же ядре величина ядрышек часто разная, ядрышки могут располагаться непосредственно под оболочкой ядра. Цвет ядрышек в опухолевых клетках может быть темно-фиолетовым, чего не бывает в клетках нормальных, в ряде случаев обнаруживаются множественные ядрышки.

Все перечисленные признаки лимфоцитарных элементов, обнаруживаемые в цитологических препаратах, далеко не всегда сопоставимы с картиной тех же клеток в гистологическом срезе. И гистологическая, и цитологическая картины – артефакт, но артефакт закономерный, обусловленный техническими особенностями методики приготовления препаратов и свойствами клеток.

Несколько слов о феномене «бласта». Дифференцировка лимфатических клеток находится в своеобразном морфологическом противоречии с остальным кроветворением. В основе этого противоречия лежит присущая только лимфоцитам способность несколько раз проходить морфологическую (с тонкопетлистым хроматином

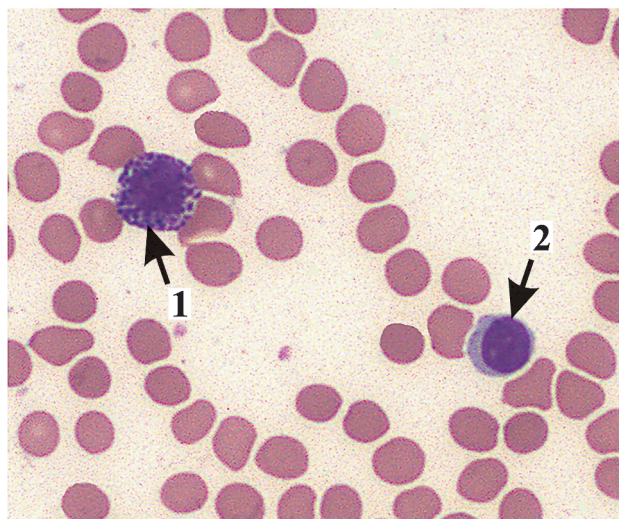


Рис. 19. Мазок крови (б. ув.).
1– базофил, 2–лимфоцит.

ядер) стадию бласта. В-клетки проходят ее, по крайней мере, трижды:

- а) на уровне класса стволовых клеток,
- б) на стадии первичного иммунного ответа и гипермутабельности,
- в) на стадии вторичного иммунного ответа, когда клетка памяти превращается в иммунобласт и далее в конечном счете – в плазмочит.

На всех этих уровнях клеточной дифференцировки и могут возникать опухоли. Бласты могут быть представлены клетками этих трех уровней и отличаются друг от друга по иммунофенотипу. Возможно, что между ними есть и морфологические отличия, но пока они не установлены.

Итак, в системе лимфопоэза бластные клетки по своей иммунофенотипической зрелости могут быть старше морфологически зрелых лимфоцитов. Казалось бы, этот факт делает совершенно бессмысленной классификацию опухолей лимфатической системы по их морфологическим особенностям. Но феномен бластоза безошибочен в оценке опухолей злокачественных. Если в клеточном субстрате опухоли преобладают бластные клетки, то такая опухоль всегда обладает отчетливыми признаками злокачественности. Значит, феномен бластоза отражает какие-то специфические для опухоли особенности, определяющие ее поведение. Эти особенности могут быть не связаны со степенью иммунологической зрелости опухолевых клеток.

Напротив, морфологически зрелый – лимфоцитарный или лимфоцитарно-пролимфоцитарный клеточный состав – соответствует, как правило, опухолям доброкачественным. Это правило имеет исключения – в частности, редкие, но очень трудные для диагностики лимфосаркомы из внешне зрелых лимфоцитов.

Понятия иммунологическая и морфологическая зрелость опухоли отражают разные характеристики опухоли, поэтому они не могут употребляться в качестве синонимов. Так, например, в процессе саркоматизации и дальнейшей прогрессии опухолей из лимфоцитов антигеннезависимых стадий дифференцировки (лимфобластных лейкозов) растет площадь ядра и цитоплазмы опухолевых клеток, ядра часто приобретают неправильную форму, в них увеличивается количество ядрышек, растет число митозов и т.д. Однако субстрат и острых лимфобластных лейко-

зов, и лимфобластных сарком всегда представлен бластными клетками, несущими маркеры антигеннезависимой стадии дифференцировки.

Опухоли из лимфоцитов антигензависимых стадий дифференцировки, находящиеся на моноклоновой стадии своей эволюции (зрелоклеточные), сохраняют способность дифференцироваться. Нередко их дифференцировка достигает конечной стадии – плазмочитов, скопления которых встречаются в гистологических срезах лимфоузлов в межфолликулярных зонах. Эти плазмочиты относятся к тому же клону, что и основная масса опухоли (при этом они могут оставаться функционально активными, о чем свидетельствует нередкая в таких случаях парапротеинемия). Благодаря способности опухолевых клеток к дифференцировке гистологическая картина фолликулярной лимфомы на моноклоновой стадии очень близка к морфологии нормального В-клеточного иммунного ответа (опухолевый фолликул, прежде всего его центр размножения, похож на реактивный). В процессе опухолевой прогрессии представленные клетки приобретают черты морфологической молодости, т.е. становятся клетками с бластной структурой ядра. Возникает вопрос: можно ли по гистологической картине препарата лимфоузла охарактеризовать весь клеточный состав лимфатической опухоли? Заключение патогистолога о наличии в препарате лимфобластов, пролимфоцитов встречается нередко. Есть ли для этого надежная объективная база? Как соотносятся бласты патогистолога с таковыми цитолога? Есть ли надежное определение бласта в гистологическом препарате? Многократно проводя сопоставления отпечатков и срезов, мы не можем дать положительного ответа на эти вопросы.

Очевидно, характеристика лимфоцитов должна даваться в препарате цитологическом, а при необходимости – путем сопоставления цитологической и гистологической картин. Вместе с тем истинные бласты, точнее, их ядра, верифицированные в цитологическом препарате, в гистологическом препарате выглядят как крупные – раза в полтора больше ядра лимфоцита – элементы со светлыми ядрами, содержащими несколько ядрышек. Кроме того, опухолевому пролиферату из бластов, в отличие от иммунобластного лимфаденита, свойственен больший разброс в величине ядер, в величине и количестве ядрышек.

ЛИМФОБЛАСТ, ИММУНОБЛАСТ И ПРОЛИМФОЦИТ

Для составления словаря названий клеток лимфоцитарного ряда, начиная от лимфоблас-

тов до лимфоцитов, был использован анализ клеток в мазках крови, отпечатках лимфоузлов

и костного мозга как здоровых лиц, так и больных различными инфекциями (инфекционным мононуклеозом прежде всего) и зрелоклеточными опухолями лимфатической системы (хронический лимфолейкоз: прогрессирующая форма, доброкачественная форма, опухолевая форма, лимфоцитомы селезенки, лимфома из клеток мантийной зоны, фолликулярная лимфома, Т-клеточный лимфолейкоз).

Лимфобласт (рис. 20). Крупная клетка, диаметром около 15 мкм, ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в пользу ядра. Цитоплазма беззернистая, обычно голубого цвета. Форма клетки овальная или круглая. Ядро – определяющий признак – имеет нежно-структурную хроматиновую сеть с равномерной окраской и калибром нитей. Ядра могут содержать 1–2 синеватых мелких, почти одинакового размера ядрышка. В отпечатке неопухолевого лимфоузла лимфобластов обычно не более 1%. В атипичных опухолевых лимфобластах ядерно-цитоплазматическое соотношение может меняться, чаще в сторону увеличения площади цитоплазмы. Меняется форма ядер, но для сохранения названия «лимфобласт» должна сохраняться и бластная – тонкопетлистая нежная сеть хроматиновых нитей.

Приведенное определение повторяет в основных чертах классические формулировки отечественных руководств предыдущих десятилетий, начиная с атласа А. Н. Крюкова.

Следует отметить принципиальную разницу в подходах к определению бласта отечественной и западных гематологических школ. Так, если по А.Н. Крюкову бластная клетка в широком смысле характеризуется прежде всего структурой хроматина, то, например, авторы Кильской классификации лимфом бластные клетки определяют по-разному. В частности, основной характеристикой лимфобласта по Леннерту является иммунофенотип (иммунологически незрелая клетка). В то же время «центробласты» автор определяет как клетки со слабо базофильной цитоплазмой, среднего размера округлым ядром и множественными ядрышками, а «иммунобласты» – как клетки с резко базофильной цитоплазмой, крупным ядром и одиночным, центрально расположенным ядрышком (Lennert, 1992). Вместо подробной характеристики ядра, исключающей произвольное толкование, упоминается лишь нежная («центро-» и «иммунобласты») и очень нежная (лимфобласты) структура хроматина. При этом допускается возможность распознавания бластных клеток не только в цитологических препаратах, но и в гистологических срезах.

Авторы REAL классификации лимфом придерживаются другого определения. К лимфобластам они относят только «...пролиферирующие клетки антигеннезависимых стадий, которые являются предшественниками всей лимфатической системы...», тогда как клетки более поздних стадий обозначаются префиксами, отражающими их локализацию в лимфоидной ткани, особенности морфологии или предполагаемую функцию в иммунном ответе (Harris, 1994). Таким образом, морфологическая характеристика бластных клеток в REAL классификации лимфом полностью заменена функциональной.

На первый взгляд функциональное определение логично, поскольку оно характеризует уровень созревания клетки. Однако функциональная оценка клетки не позволяет выделить бласт в цитологическом препарате, откуда чаще всего и начинается диагностический поиск. Увидев в мазке крови, костного мозга или в отпечатке лимфоузла клетки с тонко-петлистым хроматином цитолог должен давать им название. Таковым названием является «бласт». Иммунофенотип этих клеток будет оценен в другом препарате, часто другим специалистом. Приведенное функциональное определение бласта относится к стволочному ряду или к ранним коммитированным клеткам. Путаница в терминах, по меньшей мере, опасна, и мы будем придерживаться классического морфологического определения «бласта». Что касается ранних предшественников лимфоцитов, то для них предусмотрены свои названия, отражающие не морфологию клетки, а особенности иммунофенотипа.

Здесь ни в коем случае нельзя усматривать противопоставления классической морфологии, с одной стороны, функциональной морфологии, иммунофенотипированию, гистохимии, молекулярному анализу клеток, – с другой. Обычная окраска лимфоцитов «захлебнулась» в оценке уровня их созревания. Именно поэтому в миелограмму мы ввели понятие «лимфоидные клетки», к которым относятся и стволовые клетки и коммитированные клетки всех рядов кроветворения, и лимфоциты (И.Л. Чертков, А.И. Воробьев, 1973). В опухоли сплошь и рядом атипичные клетки могут иметь зрелый иммунофенотип, но бластную (или волокнистую, а в некоторых случаях и зрело-лимфоидную) структуру ядра. Однако надо иметь в виду, что обилие в цитологическом препарате клеток с тонко-петлистым хроматином – «бластов» – независимо от степени их иммунологической зрелости всегда свидетельствует либо об остром лейкозе, либо о гематосаркоме. Вместе с тем для цито-

логического препарата пришлось вводить понятие «атипичных клеток», «лимфосаркомных клеток», которые очень часто не имеют бластной структуры ядра. Эти клетки несут черты атипизма и полиморфизма, которые являются обязательными признаками злокачественного роста, но не имеют места в опухоли доброкачественной. Наряду с этим, они могут нести черты иммунологической зрелости.

Иммунобласт (см. рис. 20). В отпечатке лимфоузла, особенно на фоне вирусной инфекции, встречаются крупные (20–25 мкм) клетки с бластной структурой ядерного хроматина, хотя сами нити несколько толще, чем у лимфобластов. Цитоплазма беззернистая, широко варьирует и по площади (иногда занимает почти половину площади клетки), и по интенсивности окраски: от серо-голубой до темно-синей. Ядра обычно круглые и одинаковые по структуре, но различающиеся по величине. Ядрышки – такие же, как у лимфобласта, но могут быть несколько темнее. В отпечатке нормального лимфоузла иммунобластов около 1%. При выраженной антигенемии, кото-

рая характерна, например, для инфекционного мононуклеоза и токсического эпидермального некролиза (синдрома Лайелла), количество иммунобластов в отпечатках лимфоузлов может достигать десятков процентов.

Пролимфоцит (см. рис. 20). Пролимфоцит представляет собой сборное понятие различных (в морфологическом смысле!) лимфоидных клеток, лишенных признаков, свойственных ядру бласта. Пролимфоциты крупнее лимфоцитов, но меньше лимфобластов, их хроматин хотя и утратил нитчатую структуру, но разрыхлен, существенно светлей, чем у зрелых лимфоцитов. В ядрах пролимфоцитов обычно видны остатки ядрышек. Они представлены закономерно повторяющимися, одинаковыми по форме и величине просветлениями, лишенными перинуклеолярного уплотнения хроматина, характерного для ядрышек бластных клеток. Здесь необходима одна оговорка: ядрышки в лимфоидных клетках гистологического препарата могут быть хорошо видны – не только в молодых, но и в зрелых лимфоидных клетках.

ЗРЕЛЫЕ ЛИМФОЦИТЫ

Зрелые лимфоциты мы разделяем на следующие формы.

Лимфоциты малые (см. рис. 20) составляют большинство среди лимфоидных клеток как здоровых людей, так и больных прогрессирующей формой хронического лимфолейкоза (вне терминального обострения). Их характерные черты: размеры около 10–12 мкм, форма клеток круглая или овальная, цитоплазма нешироким ободком окружает ядро со всех сторон. Цитоплазма серо-голубая, перинуклеарного просветления обычно нет, зернистости также нет или видны отдельные пылевидные зернышки; ядро этого лимфоцита имеет характерную грубоглыбчатую структуру – «горы и долины» (точно такую же грубоглыбчатую структуру хроматина имеют сегменто- и палочкоядерные нейтрофилы). Ядро чаще всего располагается несколько эксцентрично, его форма округлая или овальная; нередко можно видеть небольшое вдавление (расщепленность), что, по-видимому, является нормальной особенностью этих клеток. Описанную морфологию могут иметь и В-, и Т-клетки.

Большие гранулярные лимфоциты (см. рис. 20) в единичных экземплярах встречаются у здоровых людей и существенно чаще, иногда составляя преобладающее большинство – при лейкозе из больших гранулярных лимфоцитов. Их диаметр около 15 мкм или несколько боль-

ше. Форма клетки круглая или овальная, цитоплазма серо-голубая или почти бесцветная. В цитоплазме видны сравнительно крупные – чуть меньше микрона – нейтрофильные или азурофильные гранулы. Размеры гранул неодинаковы: от крупных до пылевидных. Обычно гранул бывает несколько. Ядро круглое или овальное, хроматин – в виде гомогенной бесструктурной массы. Обычно ядро располагается эксцентрично, размеры его около 12 мкм. Иногда имеет место перинуклеарное просветление цитоплазмы. В костном мозге большие зернистые лимфоциты иногда можно спутать с миелоцитами.

Иммунолимфоциты (см. рис. 20). Лимфоциты при инфекционном мононуклеозе (И. А. Кассирский называл их «виروциты»), равно как при ветрянке, иерсениозе, а иногда и при гриппе настолько морфологически отличаются от обычных лимфоцитов, что применять к ним общее название просто нельзя. Диаметр описываемых клеток достигает 15–20 мкм, иногда больше. Форма их овальная, редко – круглая. Цитоплазма обычно широкая, может составлять больше половины площади клетки (в клетках, описанных в предыдущем разделе, она всегда меньше половины площади клетки). Иногда цитоплазма имеет широкие выросты, что делает ее похожей на моноцит (отсюда неслучайное название этих клеток – лимфомоноцит). В цитоплазме могут

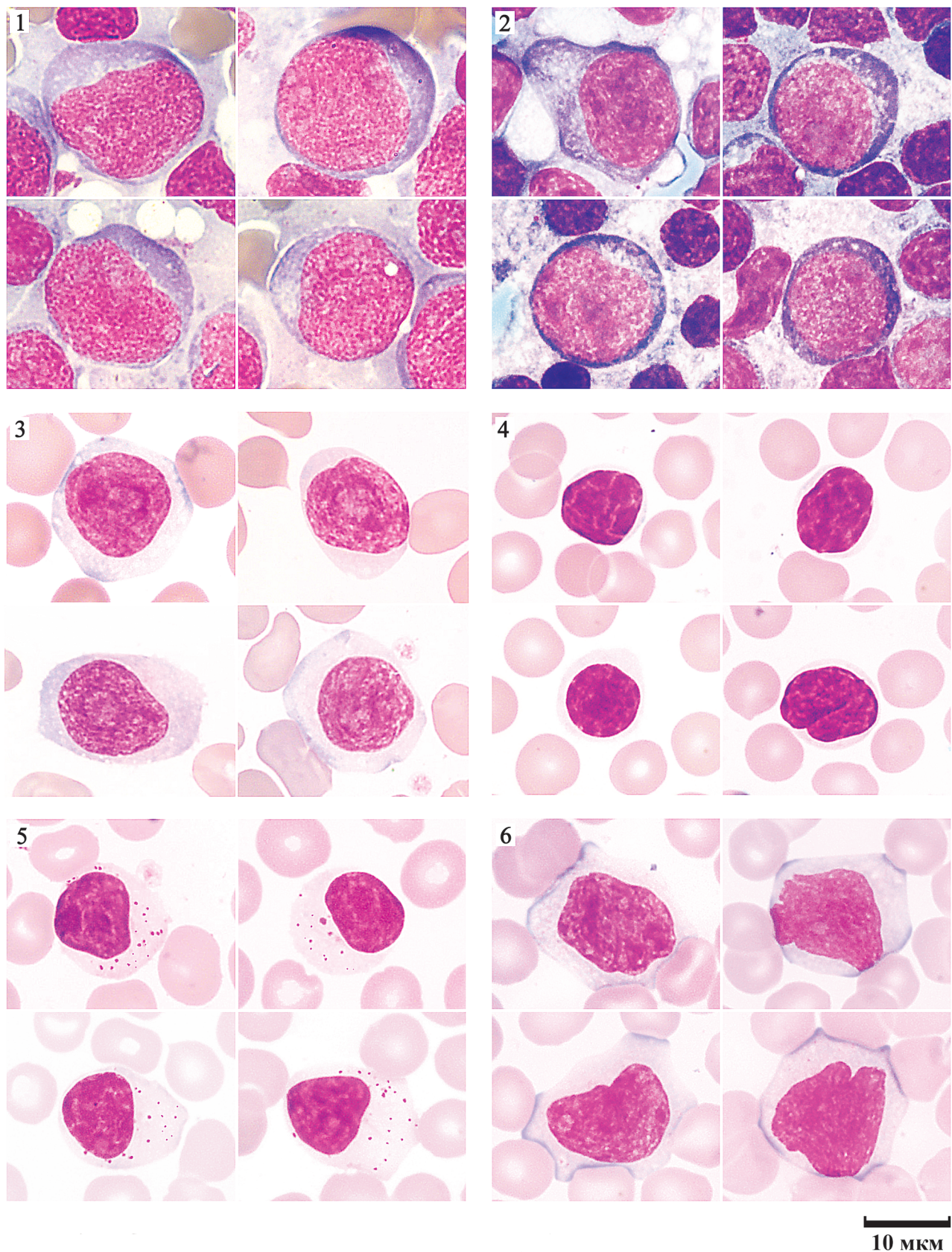
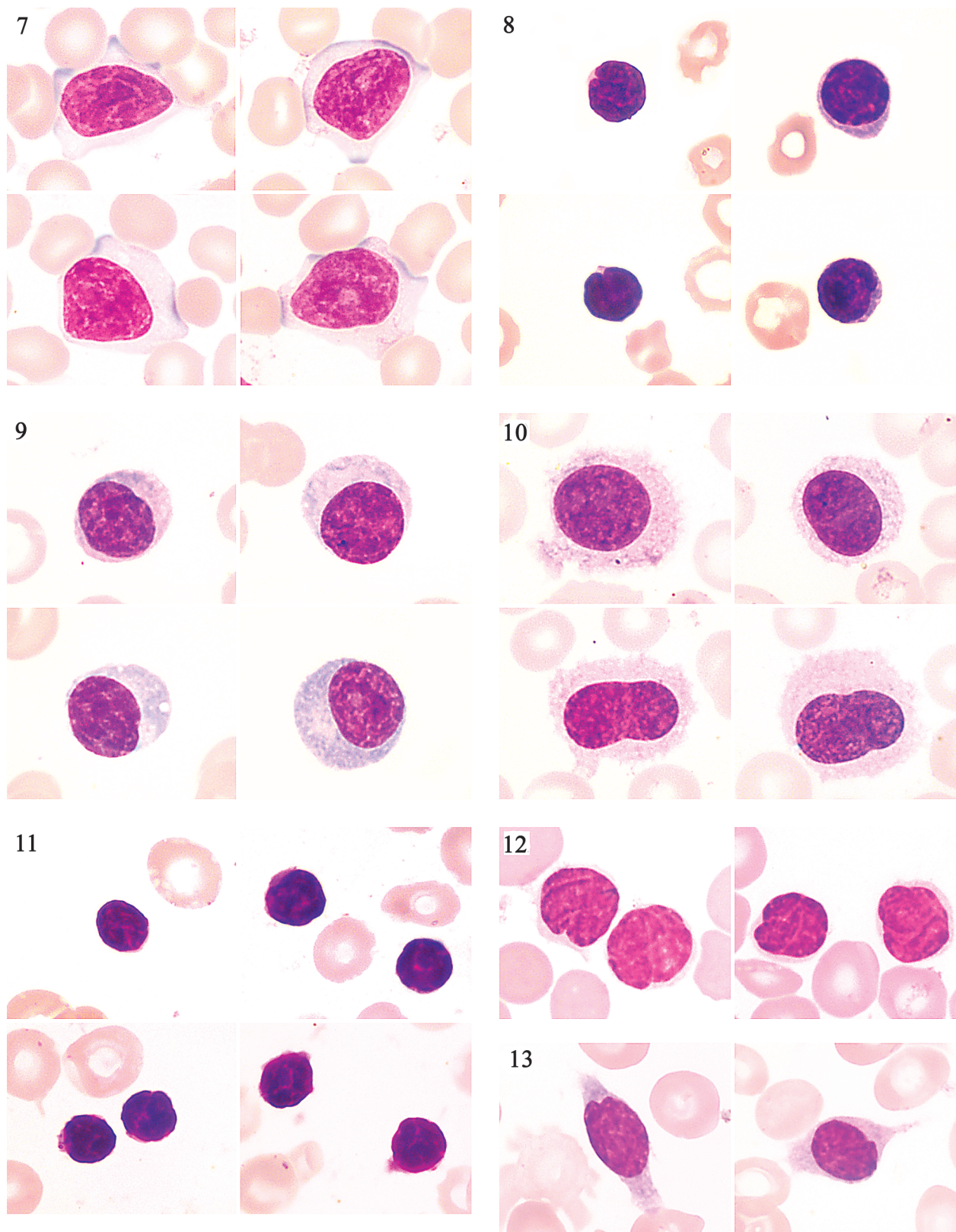


Рис. 20. Морфология клеток лимфатического ряда (б. ув.).
 1 – лимфобласты, 2 – иммунобласты, 3 – промфоциты, 4 – малые лимфоциты, 5 – большие гранулярные лимфоциты, 6 – иммунолимфоциты, 7 – лимфоциты лимфоцитомы, 8 – лимфоциты-центроциты, 9 – лимфоплазмаци-



10 мкм

ты, 10 – лимфоциты волосатоклеточного лейкоза, 11 – лимфоциты lymphadenia ossium, 12 – клетки Сезари-Лютцера, 13 – недифференцируемые лимфоциты.

встречаться отдельные азурофильные гранулы. Обычно имеется выраженное перинуклеарное просветление, а окраска цитоплазмы сгущается к периферии (до легкого фиолетового оттенка). Такие клетки с перинуклеарным просветлением и фиолетовым оттенком остальной части цитоплазмы нередко именуют плазматизированными, то есть напоминающими плазмочит. Ядро располагается эксцентрично, форма его овальная, реже круглая. В больших клетках ядро может иметь своеобразные выросты, абсолютно не свойственные лимфоциту, но характерные для моноцита. Отличие такого трансформированного лимфоцита от моноцита заключается в наличии перинуклеарного просветления цитоплазмы и меньших, чем у моноцита, размерах. Еще одним отличительным признаком служит наличие большого числа переходных форм: от клеток, типичных для инфекционного мононуклеоза, до клеток, которые весьма напоминают моноцит. Следует оговориться, что изредка встречаются формы инфекционного мононуклеоза с хроническим многолетним течением (заканчивающиеся выздоровлением), при которых клетки в цитологических препаратах невозможно отличить от моноцитов и промоноцитов. Картина крови у таких больных напоминает хронический моноцитарный лейкоз, однако выраженной гиперплазии в трепанате костного мозга, характерной для хронического моноцитарного лейкоза, при этом нет. В таких случаях отличить клетки инфекционного мононуклеоза от клеток моноцитарного ряда позволяет иммунофенотипирование. Структура ядер либо относительно однородная, с отдельными трещинами (без «гор и долин»), либо рыхлая, приближающаяся к структуре ядер пролимфоцитов (особенно – у детей), о чем дополнительно свидетельствуют остатки ядрышек в виде небольшого размера одинаковых просветлений в ядре без перинуклеолярного уплотнения хроматина.

Все три типа зрелых лимфоидных клеток встречаются вне опухолевого роста, составляя большинство лимфоидных клеток в тех или иных случаях.

Следующая группа клеток в неопухолевых заболеваниях или в нормальной крови если и встречается, то лишь в виде единичных элементов. У больных с опухолями лимфатической системы они могут составлять большинство лимфоидных клеток в крови. Определить опухолевую природу этих клеток можно с помощью иммунофенотипирования, которое позволяет выявить их клональность по легким цепям иммуноглобулинов.

Лимфоциты лимфоцитомы (см. рис. 20) – клетки диаметром 12–15 мкм, округлой или овальной формы со светло-голубой цитоплазмой. Цитоплазма обычно беззернистая, но может содержать несколько мелких азурофильных гранул. Ядро составляет около половины или чуть больше половины площади клетки, располагается несколько эксцентрично. Структура ядра однородна (без «гор и долин») с характерными трещинами. Имеется перинуклеарное просветление цитоплазмы, равномерно охватывающее периметр ядра. В ядрах нередко видно ядрышко или его остатки. У больных с доброкачественной формой хронического лимфолейкоза или лимфоцитомой селезенки подобные клетки обычно составляют основную массу лимфоцитарных элементов крови, поэтому они вполне могут называться лимфоцитами лимфоцитомы.

Лимфоциты-центроциты (см. рис. 20) – мелкие (диаметр около 7–8 мкм) клетки с плотным однородным ядром, лишенным какой-либо структурности. По своей плотности ядро центроцита похоже на ядро оксифильного эритрокариоцита, напоминая «вишневую косточку». Цитоплазма синяя, беззернистая, узкая настолько, что просматривается обычно лишь у одного из полюсов ядра. Эти клетки могут составлять основную массу лимфоидных элементов при фолликулярной лимфоме. В нормальной крови в тонком месте мазка они практически не встречаются.

Лимфоплазмочиты (см. рис. 20) – своеобразные клетки, которые встречаются при секреторирующих формах хронического лимфолейкоза. Напоминают одновременно и лимфоцит, и плазмочит. Диаметр лимфоплазмочитов около 12 мкм. Цитоплазма синевато-фиолетовая без отчетливого перинуклеарного просветления и без зернистости. Ядро имеет все черты зрелой клетки с грубой структурой хроматина (типа «гор и долин»), располагается часто столь же эксцентрично, как и у плазмочитов. Иногда ядро имеет характерные для плазматической клетки черты колесовидности.

Лимфоциты волосатоклеточного (ворсинчатоклеточного) лейкоза (см. рис. 20) представляют собой обычного размера средний лимфоцит с голубой беззернистой цитоплазмой, окружающей ядро. Ядро занимает обычно большую часть площади клетки. У многих лимфоцитов при этой форме лейкоза (в крови или костном мозге) цитоплазма имеет различной формы выпячивания: ворсинки, остrokонечные выросты и т. п. Надо заметить, что отдельные клетки с характерными выростами-ворсинками мо-

гут встречаться при многих других лимфопролиферативных заболеваниях, а также при острых лейкозах. Ядра лимфоцитов волосатоклеточного лейкоза часто довольно светлые, имеют однородную или исчерченную структуру хроматина (без «гор и долин»). При недостаточном увеличении они напоминают бласты. Отличить их от бластов помогает отсутствие у хроматина тонконищчатой структуры.

Лимфоциты костномозговой формы хронического лимфолейкоза (lymphadenia ossium) (см. рис. 20). Лимфоциты этой редкой опухоли имеют плотные темные ядра и неширокую темно-синюю цитоплазму. Эта опухоль ввиду своей редкости нуждается в дополнительном изучении, в том числе и с морфологических позиций.

Неидентифицируемые лимфоидные клетки (см. рис. 20). Кроме описанных форм лимфоцитов в мазках встречаются элементы лимфатического ряда с плотным и несколько вытя-

нутым ядром, продолговатой, зазубренной по краям цитоплазмой. Подобных клеток много в участках мазка, где эритроциты уже соприкасаются друг с другом. Изредка такие клетки встречаются и в тонком месте мазка. Их принадлежность к какой-либо опухоли лимфатической системы не определена.

Клетки Сезари-Лутцнера (см. рис. 20). Это Т-клетки размерами 8–10 мкм с неширокой цитоплазмой серого или голубого цвета, обычно лишенные зернистости. Клетки Сезари-Лутцнера имеют своеобразные складчатые или «мозговидные» ядра (такая форма ядер определяется глубокими инвагинациями ядерной оболочки). Хроматин однородный. Описываемые клетки характерны для болезни Сезари и грибовидного микоза, они встречаются и при некоторых дерматозах. При болезни Сезари они могут составлять основную массу лимфоидных элементов в крови.

МАКРОФАГИ, «КЛЕТКИ ИНОРОДНЫХ ТЕЛ»

Клетки, составляющие систему макрофагов, весьма разнообразны морфологически в зависимости от выполняемых функций. Макрофагам свойственно давать многоядерные элементы, появляющиеся за счет эндомитоза. В предлагаемом читателю Атласе будут даны те формы макрофагов, наличие которых вызывает трудности в диагностике лимфатических опухолей.

В зависимости от функциональной активности макрофаги могут иметь ядра и с плотной структурой хроматина, как у лимфоцита, и с во-

локнистой или гранулярной, как у опухолевых клеток. И в гистологическом, и в цитологическом препаратах нефагоцитирующий макрофаг может быть неотличим от лимфоцита, так как имеет такое же ядро и неширокую цитоплазму. Вместе с тем в нормальном центре фолликула можно видеть много очень крупных клеток с эксцентрично расположенным небольшим плотным ядром, в цитоплазме которых видны включения фагоцитированных частиц (рис. 21). Этих очевидных макрофагов бывает очень много при

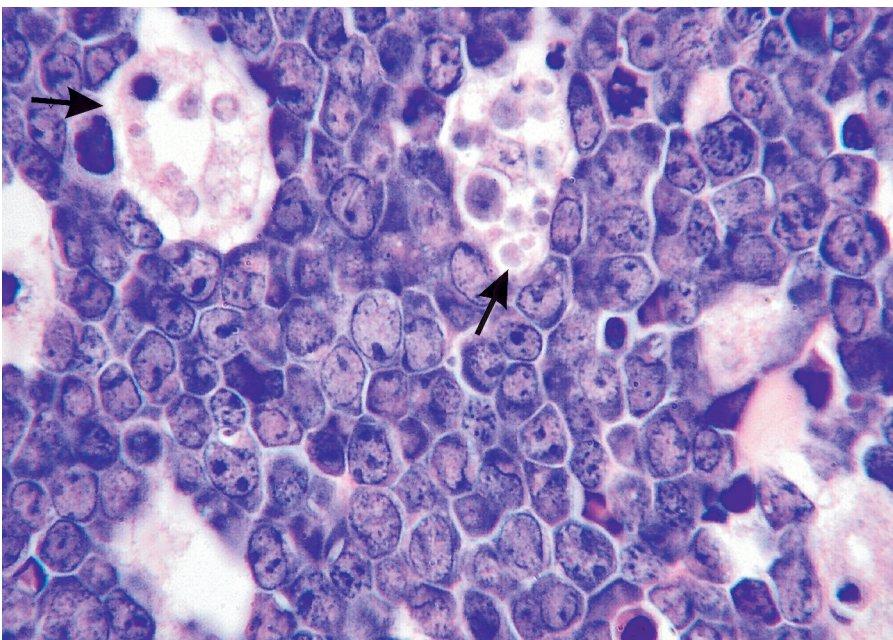


Рис. 21. Гистологический срез лимфоузла (имм.). Среди опухолевых клеток макрофаги с фагоцитированными частицами в цитоплазме.

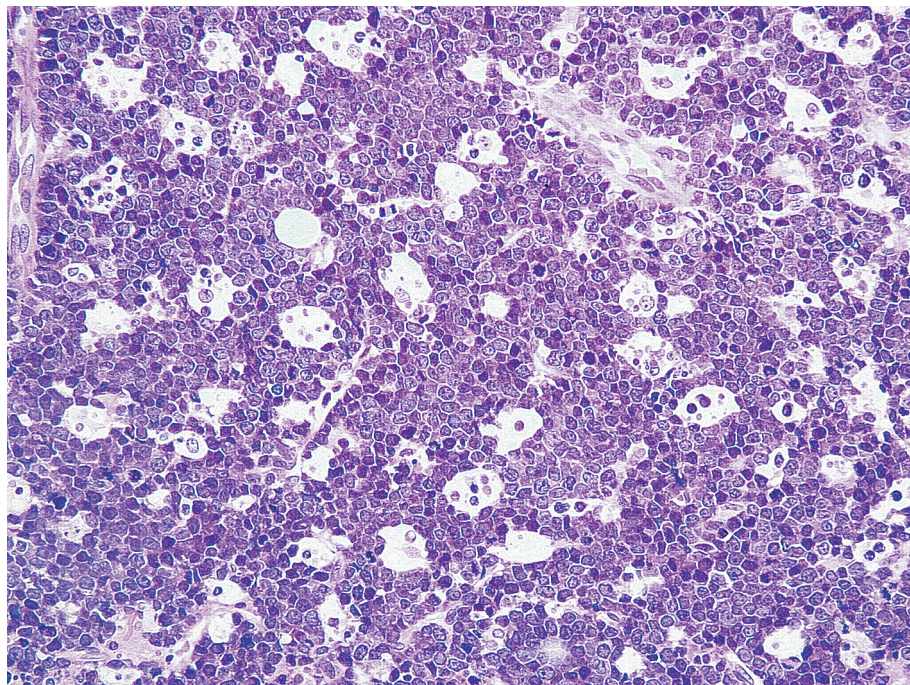


Рис. 22. Картина «звездного неба» при лимфоме Беркитта. Гистологический срез лимфоузла (мал. ув.).

быстро пролиферирующих опухолях. Они образуют структуру своеобразного «звездного неба», характерного, в частности, для лимфомы Беркитта (рис. 22). Правда, такая картина может быть и при других лимфомах, а в редких случаях ее нет и при Беркиттоподобной лимфоме. В цитологическом препарате макрофаги могут также иметь ядро лимфоцита малого или среднего размера и широкую цитоплазму с фагоцитированными частицами (рис 23).

Кроме того, встречаются макрофаги с крупным круглым ядром, иногда двухядерные, структура хроматина которых имеет отчетливо гранулярный характер. В них могут быть 1–2 мелкие одинаковые круглые синие нуклеолы. По такому характерному строению ядер макрофаги могут быть определены и вне фагоцитоза.

Своеобразный вид имеют многоядерные макрофаги туберкулезной гранулемы, очень на них похожие макрофаги болезни Бенье-Бека-Шаумана и «клетки инородных тел» (рис 24). На фоне воспаления, а также на фоне реакции на опухоль в гистологической и цитологической картине лимфоузла (и других органов) могут обнаруживаться так называемые эпителиоидные клетки (рис. 25). Их овальные ядра имеют размеры около 2–3 ядер малого лимфоцита, но структура хроматина – рыхлая. Эти эпителиоидные клетки могут

образовывать многоядерные элементы. В туберкулезном бугорке такие многоядерные клетки называются клетками Пирогова-Лангханса (рис. 26). В них ядра лежат по периферии, чаще скапливаются у одного из полюсов. Границы светлосерой цитоплазмы видны неотчетливо. Аналогичные гигантские клетки встречаются и при саркоидозе – болезни Бенье-Бека-Шаумана (рис. 27). Различия между этими клетками при саркоидозе и туберкулезе заключаются в относительной правильности расположения ядер при сарко-

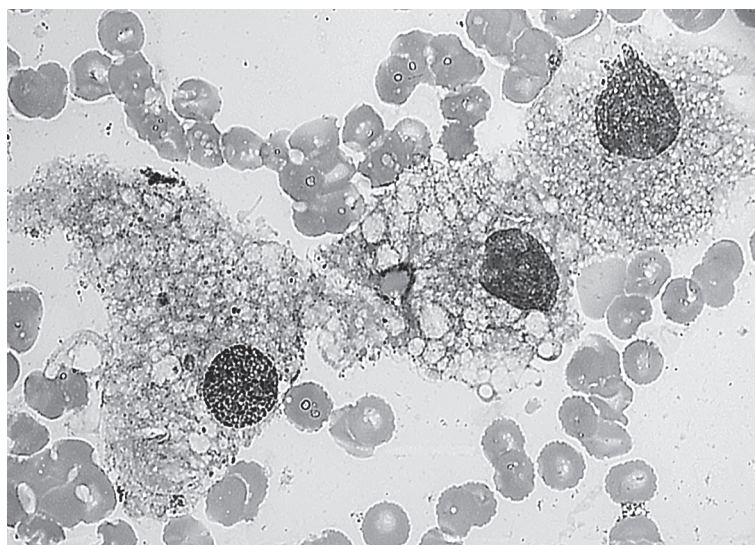


Рис. 23. Макрофаг в цитологическом препарате (имм.). В цитоплазме видны фагоцитированные частицы.

Рис. 24. Многоядерная клетка «инородных тел». Гистологический срез лимфоузла (б. ув.).

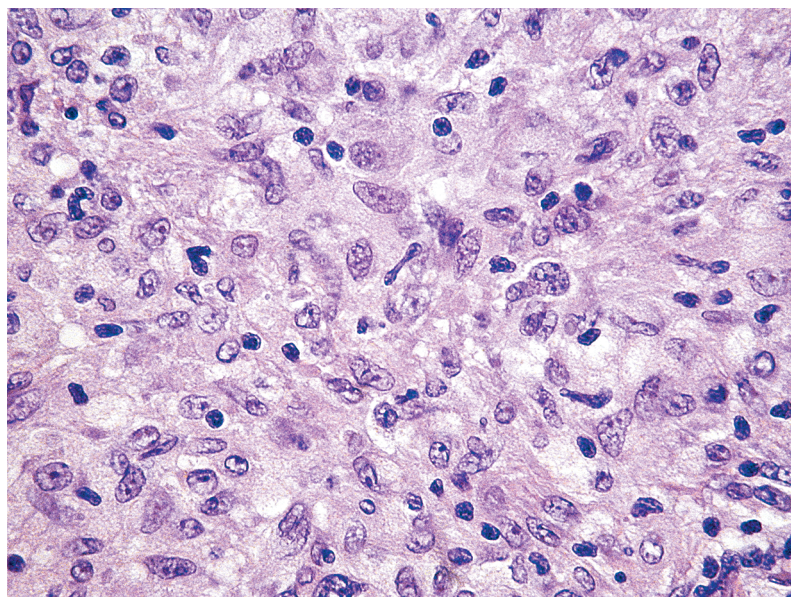
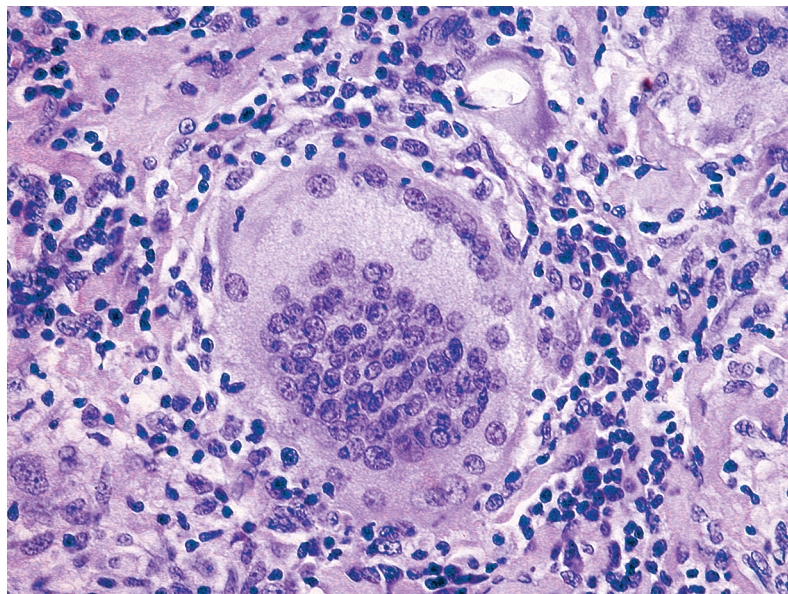
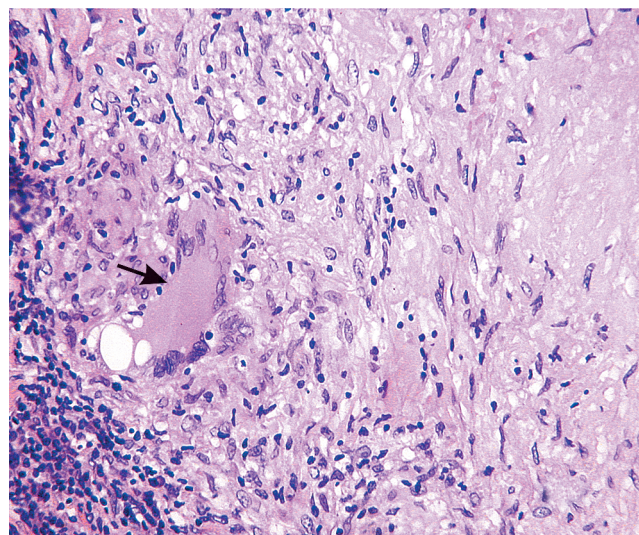


Рис. 25. Эпителиоидные клетки – вытянутые с единичными мелкими ядрышками. Гистологический срез лимфоузла (б. ув.).

Рис. 26. Туберкулезная гранулема. Гистологический срез лимфоузла (мал. ув.). Справа казеоз, в левом нижнем углу лимфоцитарный вал. Стрелкой указана клетка Пирогова-Ланганса.



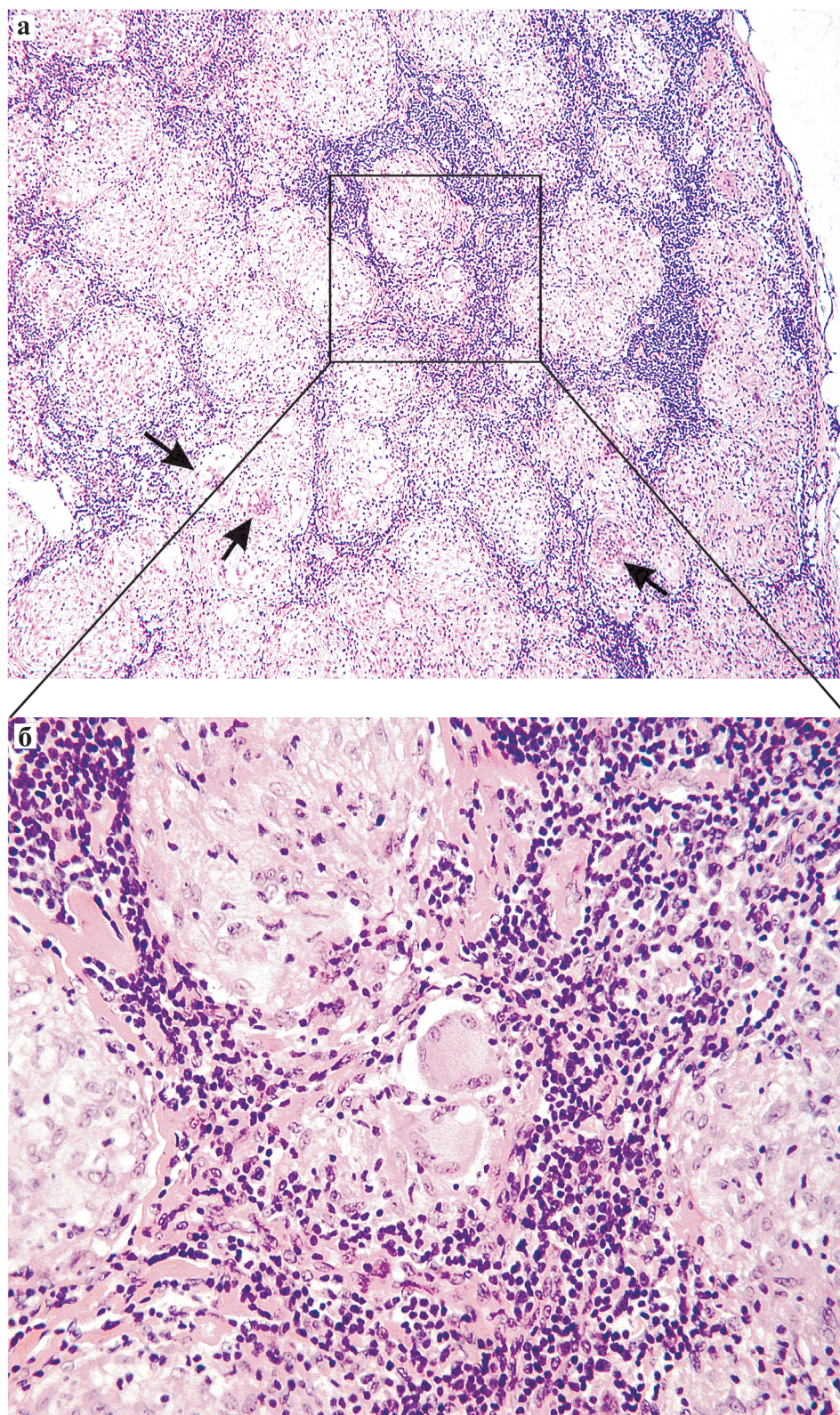


Рис. 27. Саркоидоз. Гистологический срез лимфоузла
а – (мал. ув.). Структура лимфоузла нарушена – множество гранул. Стрелками указаны клетки «инородных тел». б – (мал. ув.). Гранулемы при саркоидозе. В центре две многоядерные клетки Лангханса, вокруг лимфоцитарный вал.

идозе и обратной картине при туберкулезе. При туберкулезе ядра в этих клетках часто образуют сливающиеся скопления, структура их хроматина может быть плотной, а форма – неправильной. При саркоидозе, напротив, ядра лежат почти по всей периферии цитоплазмы, они имеют более рыхлую структуру хроматина. И тот, и другой

процесс сопровождается появлением своеобразных «бугорков», которых много при саркоидозе и очень мало при туберкулезе. Для туберкулеза характерен некроз в бугорке, саркоидозу некроз не свойственен. Эти бугорки представлены скоплением лимфоцитов. При саркоидозе сохранены сосуды, разрушающиеся при туберкулезе.

МОРФОЛОГИЯ ЛИМФОСАРКОМНЫХ КЛЕТОК

Создавая своеобразный терминологический словарь, необходимо остановиться на формализованном описании клеток лимфосарком – злокачественных опухолей лимфатической системы. К ним ко всем применимы понятия атипизм, полиморфизм, но клетки эти при детальном просмотре на большом увеличении микроскопа имеют более или менее ограниченный набор признаков измененного ядра. Распознать их в цитологическом препарате позволяют следующие характерные особенности:

- 1) крупные, но широко варьирующие размеры ядра и цитоплазмы (полиморфизм);
- 2) неправильная форма ядра и цитоплазмы, вакуолизация ядер и цитоплазмы, ее обрывчатость – цитоплазмозия (атипизм);
- 3) увеличенное число ядрышек – от двух-трех до пяти-шести в одном ядре, при этом в одной клетке могут быть и разновеликие ядрышки, и ядрышки сложной формы (в виде песочных часов и угловатые), некоторые ядрышки могут сливаться с мембраной ядра; цвет ядрышек в атипичных клетках – от синего до фиолетового;
- 4) важнейший признак – структура хроматина.

Цитологический препарат позволяет выделить следующие варианты строения хроматина (А.И. Воробьев, А.М. Кременецкая, 2000):

Первый тип, **бластный** – бластная структура хроматина, которая характеризуется тонконитчатым строением хроматиновых нитей с равномерностью их окраски и калибра (рис. 28).

Второй тип – **грубоволокнистое и волокнистое строение** хроматина в ядрах лимфосаркомных клеток (рис. 28). В нормальном лимфоузле таких клеток практически нет. При саркоме они несут все признаки атипизма и полиморфизма, имеют характерные для злокачественной опухоли особенности ядрышек. Клетки эти – чаще крупные, их размеры превышают 15–20 мкм. Вместе с тем могут встречаться и мелкие клетки с такой же структурой ядер.

Клетки с волокнистым и грубоволокнистым строением хроматина могут составлять в отпечатке большинство. Иногда, не давая «словес-

ного портрета», их относят к пролимфоцитам. Но пролимфоциты, даже будучи в большинстве при пролимфоцитарных лейкозах, довольно однотипны, не отличаются от пролимфоцитов неопухлевых. Это и понятно, поскольку пролимфоцитарные хронические лимфолейкозы относятся к опухолям доброкачественным, которым не свойственен атипизм и полиморфизм клеток. При саркоме ядра описываемых клеток имеют неправильную форму, а не овальную или округлую, как у пролимфоцитов. Кроме того, в них хорошо различимы ядрышки, часто множественные, уродливые.

Описываемые саркомные клетки с волокнистым ядром редко выходят в периферическую кровь.

Третий тип лимфосаркомных клеток имеет **лимфоидную** структуру ядерного хроматина (рис. 28). Формально такие клетки нередко подсчитывают как лимфоциты. От последних их отличают существенно большие размеры – около 15–20 мкм, а главное, они имеют все черты атипизма и полиморфизма. Несмотря на казалось бы зрелую структуру ядерного хроматина (либо гомогенно бесструктурный, либо даже имеет какое-то сходство с картиной «гор и долин»), в ядрах могут быть видны ядрышки со всеми присущими саркомным клеткам особенностями. В периферической крови этих клеток обычно не бывает.

Лимфосаркомная природа описываемых клеток определяется их резким преобладанием в отпечатке на фоне их разновеликости, уродливости форм ядер, ядрышек и цитоплазмы.

В очень редких случаях инфекционного мононуклеоза приходилось видеть такие клетки в крови в большом количестве, много их было и в пунктате костного мозга. В подобных случаях необходимо хладнокровное выжидание. Инфекционный мононуклеоз рано или поздно пройдет, размеры лимфоузлов по окончании острой фазы увеличиваться не должны.

Четвертый тип саркомных клеток принадлежит финальной злокачественной трансформации лимфомы из клеток мантийной зоны (рис. 28).

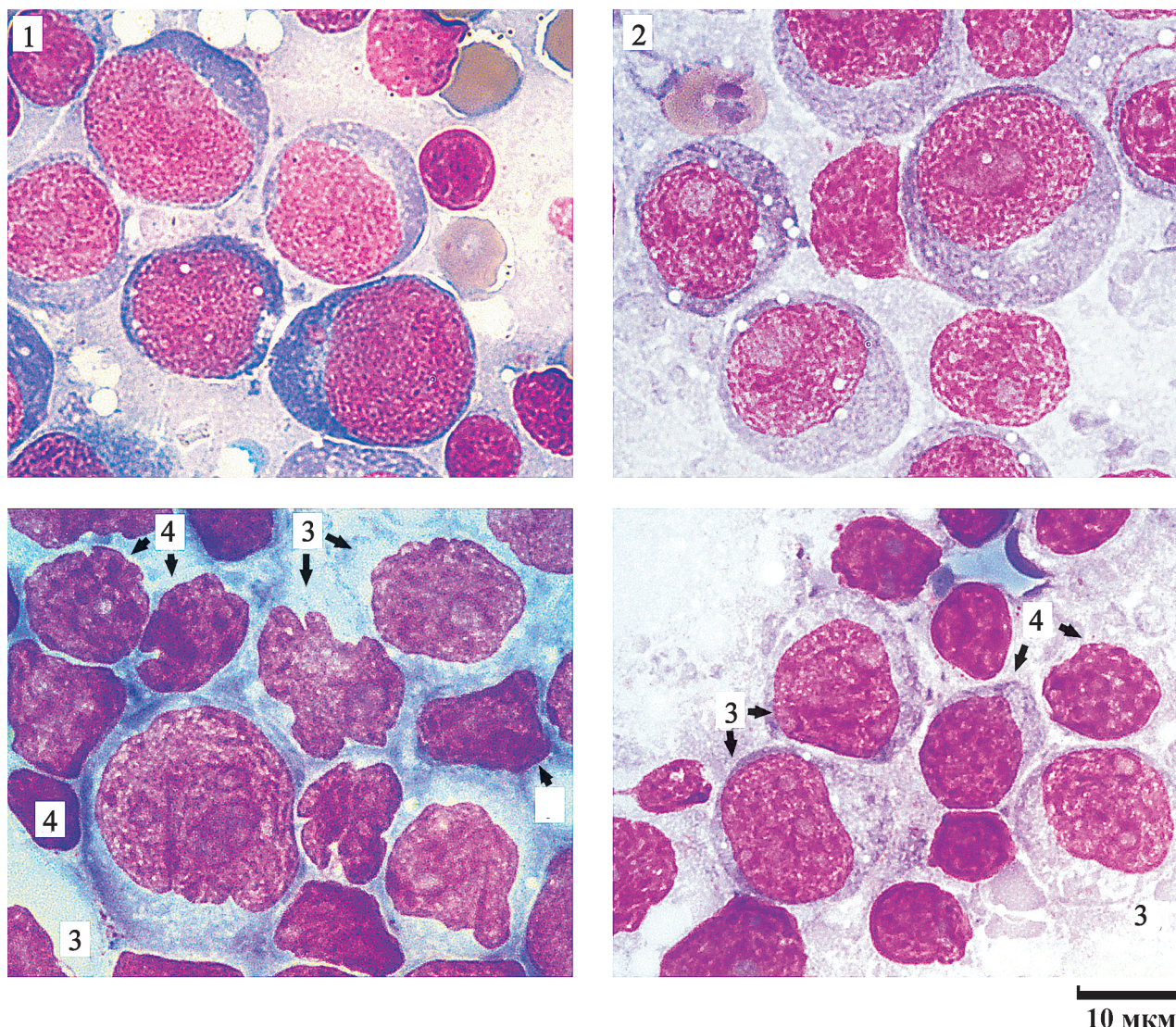


Рис. 28. Варианты строения хроматина лимфосаркомных клеток.
1 – бластный; 2 – гранулярный; 3 – волокнистый; 4 – лимфоидный.

Саркомные клетки (но не все) имеют характерную для этой опухоли гранулярность ядерного хроматина. Во всем остальном они повторяют закономерности морфологии лимфосаркомных клеток: полиморфизм, уродливость форм, уродливые ядрышки. Среди саркомных клеток могут в этом случае встречаться и атипичные лимфобласты.

Все четыре типа саркомных клеток могут быть выделены только в цитологическом препарате, но никак не в гистологическом, где они обычно представлены элементами со светлым ядром, имеющим рыхлую волокнистую структуру хроматина, темными ядрышками. Размеры этих клеток в гистологическом препарате широко варьируют и не поддаются сравнению с аналогичными клетками в цитологическом препара-

те. В гистологической терминологии для этих клеток в прошлом был более других употребляем термин «ретикулярные клетки». Давно известно, что цитолог ретикулярными называет не поддающиеся определению крупные клетки без специфической зернистости. Ими обычно являются активированные лимфоциты, макрофаги (без захваченных частиц в цитоплазме). В лимфосаркомах, при лимфогранулематозе на стадии лимфоцитарного истощения и ретикулярно-клеточного преобладания название «ретикулярные клетки» в гистологическом препарате применительно к опухолевым элементам должно быть изъято, поскольку их принадлежность к лимфатическому ряду сегодня доказана.

Важно отметить, что иногда в одном и том же препарате могут встречаться атипичные лимфо-

идные клетки с разной структурой хроматина. В отличие от цитологического гистологический препарат позволяет видеть лишь крупные размеры, неправильную форму ядер и иногда – особенности ядрышек атипичных лимфоидных клеток.

Одни и те же лимфоидные элементы в мазках-отпечатках и гистологических срезах выглядят неодинаково. Обнаружение в отпечатках биоптатов лимфосаркомных клеток имеет важное значение для постановки диагноза первич-

ной лимфосаркомы или произошедшей саркомной трансформации зрелоклеточной лимфатической опухоли. Однако цитологический препарат несет лишь часть информации, поскольку он не позволяет охарактеризовать расположение этих клеток в ткани и «наложить» их на общий рисунок органа. Кроме того, к сожалению, часто приходится иметь дело с готовыми стеклами гистологических препаратов, полученными из учреждений, где отпечатки не делаются.

КЛЕТКИ БЕРЕЗОВСКОГО-ШТЕРНБЕРГА И ДРУГИЕ ГИГАНТСКИЕ ЛИМФОСАРКОМНЫЕ КЛЕТКИ

Отдельную группу опухолевых, в том числе и саркомных, элементов составляют гигантские, большей частью многоядерные клетки.

Гигантские «диагностические» клетки **Березовского-Штернберга** (рис. 29) подробно описаны в разделе, посвященном лимфогранулематозу. Здесь надо лишь сказать, что изредка клетки, по всем формальным признакам относимые к типу Березовского-Штернберга, бывают и при других лимфатических опухолях, но без характерных гранулем, без Т-клеточного окружения. Гигантские или очень крупные, но одноядерные клетки со структурным ядром, большой сопоставимой по размерам с ядром малого лимфоцита нуклеолой (часто – зозинофильной) и широкой цитоплазмой – **клетки Ходжкина** (рис. 29, 30). Их часто находят при лимфогранулематозе, реже при других лимфатических опухолях.

И клетки Березовского-Штернберга, и клетки Ходжкина в цитологическом препарате имеют бластную структуру ядерного хроматина (рис. 31)

Мумифицированные, лакунарные, многоядерные клетки встречаются среди гигантоклеточных элементов и более мелких элементов при лимфогранулематозе, лимфосаркомах (рис. 32)

«Мумификация» ядер саркомных клеток в гистологическом препарате выглядит как фиолетовая или черная бесструктурная картина ядра, форма которого может быть и круглой, и вытянутой до червеобразности, угловатой. Цитоплазма этих клеток имеет серый цвет, нередко плохо отграничена. В цитологическом препарате уродливые ядра этих клеток имеют структурный хроматин, часто – темно-фиолетовые неправильной формы нуклеолы. Цитоплазма синеватого цвета, беззернистая.

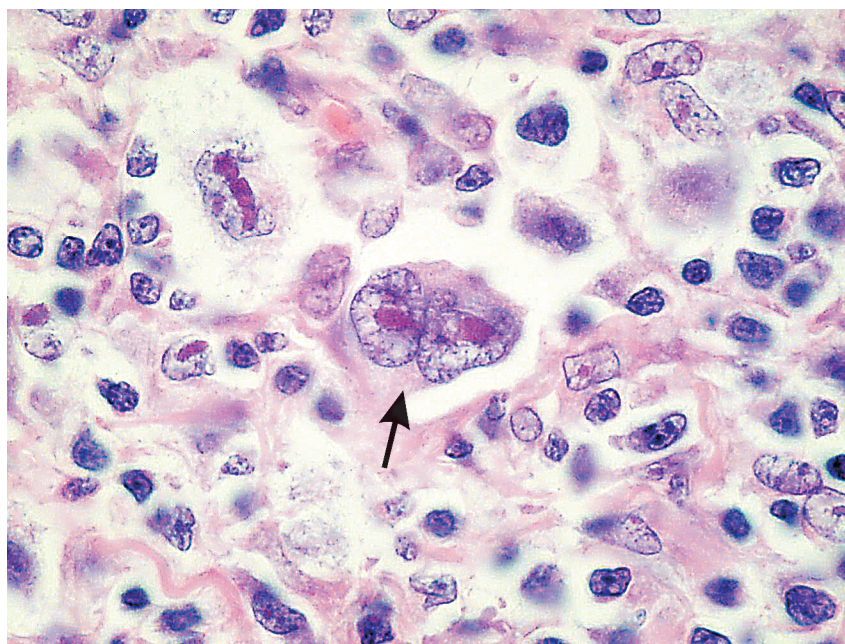


Рис. 29. Гистологический срез лимфоузла (имм.)
Стрелкой указана в центре поля зрения клетка Березовского-Штернберга.

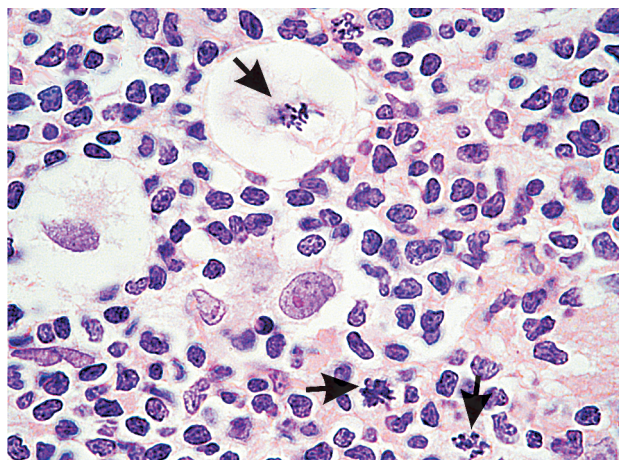


Рис.30. Лакунарные клетки. Гистологический срез лимфоузла (имм.)
Стрелками указаны фигуры митоза.

Лакунарные клетки (рис. 30, 32) очень часто отождествляют по диагностическому значению с клетками Березовского-Штернберга. Согласиться с этим никак нельзя. Лакунарные клетки бывают и при лимфогранулематозе, и при множестве лимфосарком. Форма этих клеток в гистологическом препарате бывает различной. Первый тип: гигантская клетка с бесцветной пустой цитоплазмой, в которой располагается ядро с плотным хроматином. Обычно ядро существенно меньше цитоплазмы, часто имеет неправильную форму, плотную структуру хроматина, из-

редка – нуклеолы. Второй тип: цитоплазма клетки имеет характеристики прежней, но ядро маленькое с плотной структурой хроматина, напоминает паучка. От ядра к периферии клетки идут как паутинки тонкие нити. И при первом, и при втором типе лакунарных клеток в них могут быть митозы. Третий тип: лакунарная клетка с классическими ядрами клеток Ходжкина или Березовского-Штернберга. Лакунарность этих клеток – большая пустая цитоплазма при малом ядре – обусловлена только сморщиванием в формалине ядра и цитоплазмы при сохранной оболочке. Феномен лакунарности трудно определить в замороженных препаратах. Тщательное сопоставление гистологических и цитологических препаратов (А.М. Кременецкая, 2000) показало, что широкая цитоплазма этих клеток сохраняется и в отпечатках, хотя структура их хроматина – либо волокнистая, либо бластная.

Многоядерные гигантские саркомные клетки встречаются при многих лимфосаркомах, при саркоме Ходжкина. Их отличие от клеток Березовского-Штернберга в неправильной форме ядер, отсутствии характерных крупных нуклеол, в большом разнообразии форм в одном препарате. Структура их ядер может быть одинаковой с одноядерными клетками, в том числе и маленькими, но все эти многоядерные и одноядерные элементы демонстрируют выраженный полиморфизм и атипизм и по форме и структуре ядер и ядрышек. В цитологическом

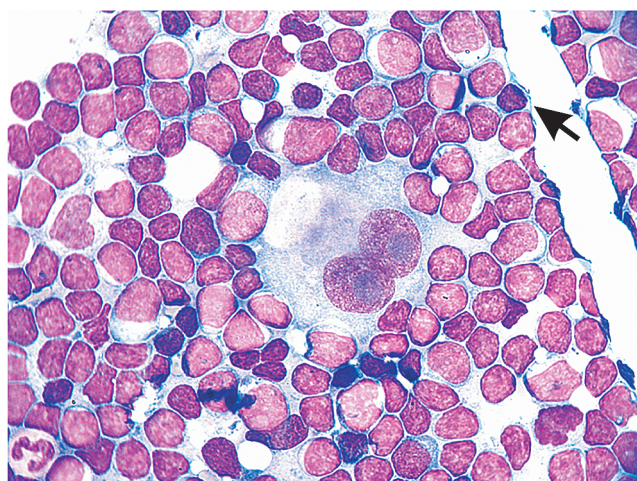


Рис. 31. Клетка Березовского-Штернберга в отпечатке лимфатического узла (имм.).
Стрелкой указан «эталонный» лимфоцит.

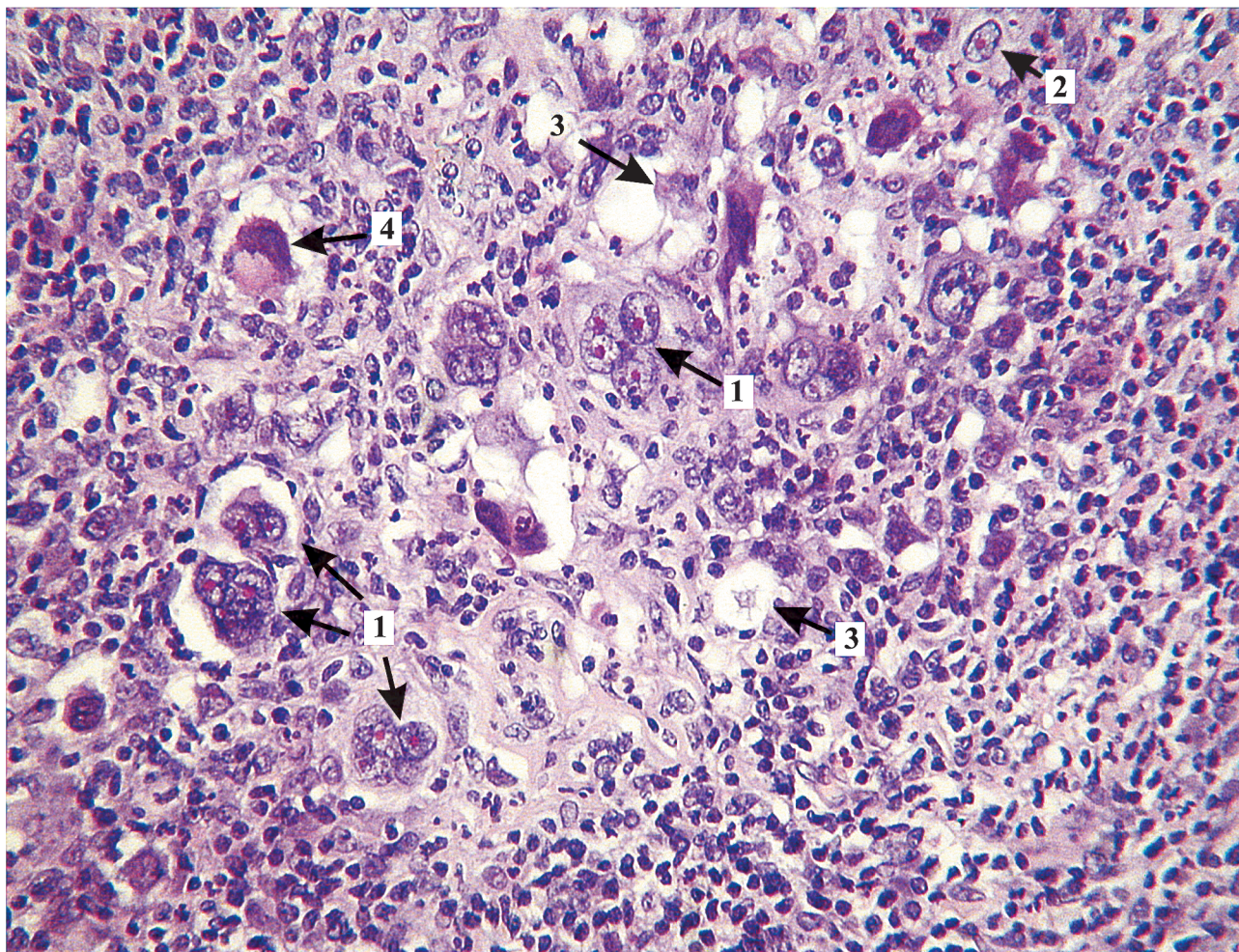


Рис. 32. Саркома Ходжкина. Гистологический срез лимфоузла (б. ув.).

Полиморфизм опухолевых клеток : 1 – клетки Березовского-Штернберга, 2 – клетка Ходжкина, 3 – лакунарная клетка, 4 – мумифицированные клетки.

препарате многоядерные клетки обычно имеют волокнистую или лимфоидную структуру ядер, темные уродливые нуклеолы. Поскольку приготовление отпечатка иногда сопровождается разрушением гигантских клеток, их цитологического аналога найти не удастся, хотя при этом видны тени ядер разрушенных очень крупных клеток.

В замороженных (приготовленных на криостате) гистологических препаратах лимфосаркомные клетки обычно выглядят как атипичные элементы с рыхлым светлым ядром и темными ядрышками. На окрашенных гематоксилин-эозином срезах хроматин этих клеток представлен разной толщины тяжами и компактными скоплениями (хромоцентрами), которые часто невозможно отличить от ядрышек. Кроме того, во многих крупных и гигантских атипичных клетках оптическая плотность изображения на отдельных

участках среза настолько мала, что создается впечатление наличия в ядре пустот. Тем не менее все перечисленные артефакты, присущие стандартной методике приготовления гистологических препаратов, как правило, не мешают видеть на срезах ключевые признаки злокачественности новообразования – атипизм и полиморфизм клеточного состава. Вместе с тем нельзя забывать о существовании мелкоклеточных лимфосарком и лимфосарком, в которых атипичные клетки составляют доли процента от всей клеточной популяции в биоптате. В этих случаях избежать ошибки можно путем тщательного изучения всей площади среза через объектив $\times 40$ или на иммерсии (объектив $\times 100$). Особую настойчивость в поиске атипичных элементов следует проявлять при зрелоклеточных лимфатических опухолях, где клинические признаки указывают на вероятность саркомной трансформации.

О ПРОИСХОЖДЕНИИ ОПУХОЛЕЙ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Как уже говорилось, в современных международных классификациях новообразования лимфатической системы принято соотносить с этапами нормальной дифференцировки лимфоцитов. Кроме того, отдельные опухоли соотносятся с конкретными структурами внутри вторичных лимфоидных органов. Поэтому в перечне нозологических форм фигурируют такие названия, как лимфома из клеток центра фолликула, мантийной или маргинальной зон. С этой терминологией следует согласиться, поскольку ни одно название в принципе не может отразить всех особенностей, присущих той или иной лимфатической опухоли. Необходимая оговорка состоит в том, что внешнее сходство нормальных и опухолевых лимфоцитов не может служить доказательством их общего органогенеза – источником опухолевого роста может быть совершенно иной пласт клеток, нежели тот, что заселяет лимфатическую ткань здоровых лиц в данный период времени. Так, например, многим новообразованиям лимфатической системы свойственны возрастные пики заболеваемости, в промежутках между которыми эта опухоль практически не встречается. В частности, ни дети, ни молодые люди лимфомой из клеток мантийной зоны не болеют. Поскольку вторичные фолликулы и соответственно зона мантии присутствуют в лимфоузлах и детей, и стариков, объяснить особенности эпидемиологии этой опухоли возрастными различиями в строении лимфатической ткани невозможно. К другим новообразованиям лимфатической системы, широко распространенным среди лиц пожилого возраста и чрезвычайно редким у молодых, относятся волосатоклеточный лейкоз, лимфоцитомы и хронический лимфолейкоз (случаи развития этих опухолей у детей неизвестны).

Заслуживают внимания и другие наблюдения. В частности, идентичные по своей морфологии, иммунофенотипу и цитогенетическим нарушениям острые лимфобластные лейкозы детей и взрослых принципиально различаются по ответу на терапию, что заставило выделить эти опухоли в самостоятельные нозологические фор-

мы. Логично предположить, что столь разный прогноз этих лейкозов, одинаковых по всем известным на сегодня признакам, обусловлен их разным гистогенезом, происхождением из разных закладок или «пластов» лимфатической ткани, закономерно сменяющих друг друга с возрастом (А.И. Воробьев, 1985).

Представленные факты – весомый аргумент в пользу того, что источником опухолевого роста могут служить не только те клетки, которые активно функционируют во взрослом организме на момент возникновения опухоли, но и другие, по каким-то причинам не полностью из него вытесненные. Оказавшись «не в том месте» и «не в то время», эти клетки подвергаются онкогенной трансформации, давая начало опухолевому росту. В прошлые годы нормальные предшественники выделяли, опираясь на внешнее сходство опухолевых клеток с теми или иными элементами лимфатического ряда. Но такой морфологический подход не может учитывать изменчивость опухолевых клеток в процессе опухолевой прогрессии. К тому же у некоторых опухолевых клеток вообще нет никакого нормального морфологического эквивалента (такими, в частности, являются лимфосаркомные клетки, лимфоциты волосатоклеточного лейкоза, клетки Березовского-Штернберга и Ходжкина).

В Атласе почти не обсуждаются вопросы этиологии лимфом. Ошибка в митозе, ведущая к появлению бессмертного клона, чаще всего носит характер случайного акта. Последствия воздействия мутагенов, на каждом шагу подстерегающие митоз, блокируются системой апоптоза. И если эта система дает «сбой», то виноваты в этом либо наследственные дефекты лимфопоэза, применительно к лимфомам, либо массивность мутационного воздействия, в частности, высокие дозы ионизирующей радиации или цитостатических препаратов. Поскольку опухоли клональны, роль вирусов в их возникновении можно обсуждать также с позиций мутагенеза. Правда, вирусы в этом случае должны тащить за собой эпидемиологический шлейф. Такогового нет.

«ИНСТИНКТ ДОМА» В ОПУХОЛЯХ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Поскольку большинство лимфоцитов постоянно мигрирует из сосудистого русла в органы иммунной системы и обратно, то метастазиро-

вание лимфатической опухоли в тот или иной орган отражает способность опухолевых клеток не столько к переносу, сколько к имплантации в

данном органе, в его конкретных структурах (А.И. Воробьев, 1985, 2003).

Клетки иммунной системы не только постоянно перемещаются между анатомически отдаленными структурами, но и способны возвращаться в тот или иной орган (например, костный мозг) или систему тканей (в частности, эпителиальных). Этот феномен, получивший название «инстинкта дома», обусловлен молекулами адгезии, регулирующими межклеточные взаимодействия. Помимо иммунных реакций, молекулы адгезии принимают участие в эмбриогенезе, свертывании крови и воспалении.

Многочисленные факты указывают на важнейшую роль «инстинкта дома» при опухолях лимфатической системы. Например, многие первичные лимфосаркомы, такие, как первичная В-клеточная лимфосаркома средостения или лимфосаркома желудка, обычно долго не выходят за границы первичного очага опухолевого поражения (А.И. Воробьев, 1985, 2003; Lennert, 1997). В то же время лимфома из клеток мантийной зоны, как правило, генерализована уже на момент первичного осмотра больного. Однако и тут нужна оговорка. В рамках казалось бы, одной нозологической формы, в частности, лимфомы из клеток мантийной зоны, возможно длительное ограниченное только одним местом роста развитие опухоли (например, селезенка, орбита)

При опухолевом росте проявляется принципиальное различие лимфатической ткани разных частей тела: одни лимфоузлы поражаются чаще, другие – реже. Отдельные группы лимфоузлов остаются интактными на протяжении многих лет и нескольких рецидивов. В частности, в кубитальных или подколенных лимфоузлах, даже при тотальной генерализации любой лимфатической опухоли метастазы обнаруживаются крайне редко. Все сказанное дает основания думать, что профиль экспрессии молекул адгезии в лимфоузлах разных частей тела неодинаков (косвенно на это указывает разный рисунок строения шейных, брыжеечных и паховых лимфоузлов) (А.И. Воробьев, 2003).

Рассмотрим некоторые молекулярные механизмы, определяющие расположение очагов опухолевого роста при новообразованиях лимфатической системы.

Хронические лимфолейкозы

Установлено, что способность к трансэндотелиальной миграции лимфоцитов значительно сильнее выражена при хронических лимфолейкозах, сопровождающихся лимфаденопатией. Выявлена связь этого симптома с уровнем экспрессии интегрин α_4 на опухолевых клетках: в

отсутствие увеличенных лимфоузлов уровень экспрессии этой молекулы адгезии низкий, а при наличии лимфаденопатии, наоборот, – высокий (Till, 2002).

Фолликулярные лимфомы

При этом заболевании опухолевые лимфоциты экспрессируют интегрин $\alpha_4\beta_1$, лигандом которого является молекула адгезии VCAM-1 на фолликулярных дендритических клетках отдельных групп лимфоузлов и селезенки. Взаимодействие $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1, с одной стороны, препятствует апоптозу лимфоцитов, а с другой, – способствует образованию центров размножения, чем обусловлен характерный для этой опухоли нодулярный тип роста. Установлено, что переход фолликулярных лимфом от нодулярного типа роста к диффузному обусловлен не столько снижением уровня экспрессии интегрин $\alpha_4\beta_1$, сколько разрушением сети фолликулярных дендритических клеток (Freedman, 1990; Koopman, 1994).

Лимфома из клеток мантийной зоны

В случаях лимфомы из клеток мантийной зоны с вовлечением кишечника опухолевые лимфоциты экспрессируют интегрин $\alpha_4\beta_7$ (его лигандом является молекула адгезии MAdCAM-1 на клетках кишечного эпителия). При интактных органах желудочно-кишечного тракта интегрин $\alpha_4\beta_7$ на опухолевых лимфоцитах не обнаруживается. Показано, что у больных с лимфомой из клеток мантийной зоны экспрессия интегрин $\alpha_4\beta_7$ может служить предвестником поражения кишечника (Briskin, 1993; Pals, 1994; Geissmann, 1998).

Первичная В-клеточная лимфосаркома средостения

Культура клеток линии MedB-1, выделенных от больного с первичной В-клеточной лимфосаркомой средостения, обладает тропизмом к мозговому веществу тимуса (конкретные молекулы адгезии неизвестны) (Moller, 2001).

Представленные факты говорят о том, что рассмотренный выше подход к дифференциации новообразований лимфатической системы по их принадлежности к тем или иным структурам внутри лимфоузла – мантийная зона, центр фолликула, маргинальная зона – необходимо принимать наравне с местом первичного возникновения опухоли – в лимфоузлах конкретной группы (например, шейных, подчелюстных или пахово-бедренных) либо конкретных органах (в частности, в селезенке, миндалинах, щитовидной железе, бронхах, желудке, головном мозге). Сказанное исключает возможность употребления в формулировке диагноза таких обобща-

ющих терминов, как «диффузная крупноклеточная лимфома» или «лимфома из клеток маргинальной зоны» безотносительно к локализации основного очага опухолевого роста. Кроме того, поскольку появление новых очагов опухолевого

роста часто отражает качественные изменения в поведении всей опухоли, указание стадии по классификации Энн-Арбор не может служить альтернативой подробному перечислению вовлеченных органов и групп лимфоузлов.

ВОПРОСЫ КЛАССИФИКАЦИИ ОПУХОЛЕЙ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Любая классификация болезней представляет собой попытку установления общего языка между врачами, по крайней мере, в обозначении, разграничении какой-то группы похожих заболеваний. При этом даже в рамках одной группы исследователей добиться единодушия бывает трудно. Кому-то кажется, что отличия картины болезни должны считаться основанием для выделения самостоятельных форм, другие готовы клинические или морфологические различия стадий болезни оставлять внутри одной нозологической формы, хотя лечение этих стадий не одинаково. Для установления общего языка с читателем (или для объяснения позиции авторов) приводим определение «нозологической формы», как это было когда-то предложено в медицинской энциклопедии.

Под **нозологической формой** понимаются заболевания, имеющие сходство в клинической картине болезни, ее патогенезе, морфологии и специфическом лечении. Иногда определяющей является этиология. Например, холера, чума (но и там – две формы). Однако туберкулезная палочка может вызывать и туберкулез легких, и туберкулез почек. А это – разные болезни. Для опухолей, но не только для них, очень важным элементом в определении нозологической формы является специфическая программа лечения, так как небольшие, на первый взгляд, отличия в поведении или иммунофенотипе опухоли часто означают принципиально разный прогноз, если их лечить одинаково. С другой стороны, могут быть очевидные различия и в морфологии, и в иммунофенотипе, например, при лимфоме головного мозга, но терапия этих лимфом единая, уникальная, дающая хороший результат. Поэтому, по крайней мере на сегодня такие опухоли можно считать одной нозологической формой.

Ничего застывшего в классификациях опухолей быть не может. Вполне допустимо, что в ближайшем будущем исследователи сочтут необходимым разделять одни и те же формы опухолей на неправильно предлеченные (даже не в рецидиве) и первичные «интактные». Их терапия и прогноз различны.

Не имеет смысла подробно рассматривать принципиальную, т.е. нозологическую разницу

хронического лимфолейкоза и развившуюся в его прогрессии саркомную трансформацию. Ясно, что развернутая стадия хронического миелоидного лейкоза и его бластный криз – разные болезни.

Вместе с тем без согласия, пусть временного, по основным названиям болезней, работать трудно. Всегда есть риск сорваться в «вавилонское столпотворение». Но и это предупреждение надо принимать не безоговорочно. Что делать врачу, если «большинство» на каком-то заседании, пусть международном, приняло решение делить все воспаления легких на две формы – «госпитальные» и «внегоспитальные», забыв о формах в зависимости от возбудителя (от разных бактерий, грибов до разных вирусов), забыв об очаговых и крупозной (вновь смертельно опасной)? Тут придется напомнить старую истину, что большинство не прав всегда, и «...главу перед молвою не клонить...». В противном случае – беда. Как всегда за ошибку чью-то ответит больной своей загубленной жизнью.

Вот со всеми этими оговорками мы придерживаемся международной классификации ВОЗ 2001 г., лучшей из всех прошлых международных, о принципиальных ошибках которых мы писали неоднократно. В классификации ВОЗ 2001 г. почти изжит «диктат» гистологии и дается и цитологическая картина отпечатков, намечены элементы признания опухолевой прогрессии, в какой-то степени стала учитываться особенность опухоли в зависимости от ее локализации. Все это сняло принципиальные различия разного времени классификаций нашей страны и многочисленных классификаций, принимавшихся на какой-то срок в других странах.

Надо специально подчеркнуть, что авторы большинства международных классификаций подчеркивали их недостаточную точность, призывали адаптировать их к национальным классификациям, приглашали к дискуссии. Применительно к классификации опухолей в целом, но особенно к классификации опухолей лимфатической системы, такой призыв имеет важнейшее значение. Есть опухоли регионов. Например, рак печени. Но особенно важно выделять опухоли с ярко выраженной генетической пред-

расположенностью, например, лимфома Беркитта. Ведь так называемая спорадическая форма лимфомы Беркитта – иная болезнь. С другой стороны, у народов тюркской группы почти не встречается хронический лимфолейкоз. Ясно, что этим различия опухолей лимфатической системы у разных народов не ограничиваются.

В описании лимфом мы, придерживаясь рамок классификации ВОЗ 2001 г., все отклонения от нее специально оговариваем. Поскольку в атласе использованы только собственные наблюдения авторов, несколько редких форм, приведенных в классификации ВОЗ, у нас, к сожалению, не смогли найти отражения.

В нашем атласе читатель не встретит «обобщающих» терминов типа «злокачественные лимфомы», поскольку подробно разобраны отличия опухолей злокачественных и доброкачественных, не встретит лишнего смысловой нагрузки термина «неходжкинские лимфомы», не будут упоминаться лейкозы по номерам – FAB-классификация, которая опущена и в классификации ВОЗ. Названия болезней – традиционны, живут веками, хотя часто бывают устаревши-

ми, нерациональными, но все-таки это – не улицы Нью-Йорка, различающиеся лишь номерами...

В нашей стране работы по вопросам классифицирования лимфатических опухолей публиковались Н.М. Шустровым, Х.Х. Владосом (1927), М.И. Аринкиным (1928), Е.И. Фрейфельд (1947), И.А. Кассирским и Г.А. Алексеевым (1948 и 1971), А.И. Воробьевым и М.Д. Бриллиант (1985–2003). В описании нозологических форм все перечисленные авторы учитывали как особенности клинической картины, так и морфологию опухоли, которая давалась и в гистологическом, и в цитологическом препаратах. В силу сложившихся традиций классификации лимфатических опухолей в нашей стране отличались преемственностью, учитывали в выделении форм все известные на то время признаки заболевания (нозологический принцип классификации). Отсутствие единого принципа классифицирования (его просто нельзя сегодня дать) привело к тому, что наши классификации опухолей представляют собой в действительности их перечень.

ВОПРОС О ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ФАКТОРАХ

Оценка прогностических факторов стала в последние годы довольно популярной темой публикаций по проблемам гемобластозов. Одной из первых прогностических моделей является выделение стадий лимфогранулематоза по степени распространения опухоли, принятой на конференции в Анн-Арбор, 1975. Она вскоре начала применяться и при других опухолях лимфатической системы. Для «первично» генерализованного хронического лимфолейкоза были разработаны свои прогностические модели – классификации Раи и Бине (Rai, 1975; Binet, 1981). Сразу надо оговориться, что, поскольку эти прогностические модели не учитывали основной особенности опухолевого роста у конкретного больного – опухолевой прогрессии, зависимости прогноза не столько от размеров опухоли, сколько от ее мутабельности, появления субклонов, степени атипизма и полиморфизма, значение их было невелико. Основным «объектом» их использования были испытания тех или иных цитостатических препаратов, где индивидуальный прогноз значения не имел, поскольку основную роль играла статистика больших чисел.

Число выделяемых прогностических факторов непрерывно увеличивается, на их основе разрабатываются все новые прогностические

модели. Среди них наибольшее распространение получил так называемый Международный Прогностический Индекс или IPI.

По результатам статистического анализа историй 2031 больного с «неходжкинскими лимфомами промежуточной и высокой степеней злокачественности» были выделены пять клинических и лабораторных факторов, имевших независимое прогностическое значение: активность ЛДГ в сыворотке крови (норма против повышенной), возраст (≤ 60 или > 60 лет), стадия опухоли по классификации Анн-Арбор (I и II против III и IV), тяжесть состояния по 4-балльной шкале (≤ 1 или ≥ 2) и количество экстракандальных очагов опухолевого поражения (≤ 1 против > 1). Каждый из этих факторов был приравнен к одному баллу, по сумме которых больные попадают в одну из 4-х групп риска: низкого (0–1 балла), промежуточно-низкого (2 балла), промежуточно-высокого (3 балла) и высокого (4–5 баллов). Авторы полагают, что в первых трех группах можно ограничиться стандартным лечением, а в последней необходима высокодозная полихимиотерапия.

Представленный подход, в соответствии с которым предпочтительная программа терапии определяется суммой баллов, значительно упрощает принятие решения, а в случае неудачи

снимает с врача юридическую ответственность. В то же время подмена клинического подхода арифметическим, исключающим анализ причин устойчивости опухоли к выбранной схеме лечения, не позволяет рекомендовать эти прогностические модели для практического применения у конкретного больного. Индивидуальный прогноз можно оценивать лишь в рамках определенной нозологической формы с учетом характеристик опухолевой прогрессии (поражение экстранодальных зон, наличие субклонов, выраженность клеточного атипизма, угнетение нормального гемопоэза и т.п.), и то – лишь с определенной долей вероятности. Часто хорошим прогностическим ориентиром служит ответ на терапию: достижение ремиссии в течение 2–3 курсов или отсутствие таковой, сохранение опухолевой ткани в какой-то области и т.п.

Следует иметь в виду, что прогноз в конкретной ситуации часто зависит от правильной адресности проводимого лечения. Недавний «золотой стандарт» при самых разных лимфосаркомах – программа СНОР – в значительной группе лимфосарком теперь заменен другими, существенно более эффективными программами. При этом ни степень распространенности, ни наличие интоксикации на прогнозе могут и не сказываться. Например, при Беркиттоподобной лимфосаркоме, если не было неадекватной предлеченности, в большинстве случаев достигается полная многолетняя ремиссия при специальной программе, несмотря на картину выраженной интоксикации, огромную распространенность опухоли, синдром сдавления и т.п.

Все эти вопросы являются предметом специального анализа при конкретных нозологических формах.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

В последние годы в диагностике новообразований лимфатической системы используются методики, позволяющие анализировать антигенную и генетическую структуру опухолевых клеток. Вместе с тем взятые отдельно результаты иммунологического, или цитогенетического, или молекулярно-генетического исследования часто трудно интерпретировать. Это обусловлено, с одной стороны, наличием случаев, не укладывающихся в границы известных нозологических форм, а с другой – изменчивостью новообразований лимфатической системы в ходе опухолевой прогрессии.

Не меньше противоречий и в результатах стандартных методов исследования генома – классической цитогенетики, флюоресцентной гибридизации *in situ* и полимеразной цепной реакции. Так, например, транслокацию

t(2;5)(p23;q35) находят не только при «анапластических крупноклеточных лимфомах», но и у больных с лимфогранулематозом (саркомой Ходжкина?), а характерная для лимфомы из клеток мантийной зоны транслокация t(11;14)(q13;q32) обнаруживается при миеломной болезни и хронических лимфолейкозах. В то же время при самой лимфоме из клеток мантийной зоны иногда находят дополнительную транслокацию t(14;18)(q32;q21), которая считается характерной для фолликулярных лимфом. Транслокация t(8;14)(q24;q32) может выявляться в качестве вторичной хромосомной аномалии в терминальной стадии заболевания при диффузной В-крупноклеточной лимфоме, лимфоме из клеток мантийной зоны, множественной миеломе, фолликулярной лимфоме и всегда является прогностически крайне неблагоприятной.

БИОПСИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА

Лимфаденопатия – клинически значимое увеличение, или появление плотной консистенции лимфатического узла (узлов), определяемое пальпацией или с помощью дополнительных методов исследования (лапароскопия, ультразвуковое исследование, рентгеновская, магнитно-резонансная, компьютерная томография и др.). К лимфаденопатии же относится и пальпируемость лимфатических узлов в необычном месте: заднешейные, кубитальные, бедренные и т.п.

Увеличенным лимфоузлом считают, когда его размер по меньшей (поперечной) оси превышает 1 см. Однако подмышечный лимфоузел в норме может быть несколько больше 1 см, а паховый, особенно у мужчин, может иметь наибольший размер до 2–4 см.

Не надо биопсировать появившийся внезапно, в течение 1–2 дней увеличившийся и застывший в своих размерах деревянной плотности подчелюстной или подбородочный лимфоузел. В этих случаях, как правило, речь идет о

закупорке слюнного протока смешанной железы.

В большинстве случаев тщательный сбор анамнеза и детальное клиническое обследование позволяют установить причину воспалительной лимфаденопатии и принять решение об адекватном лечении.

Биопсия лимфатического узла при отсутствии клинических признаков воспалительного процесса необходима в следующих случаях:

- узел имеет очень плотную консистенцию, независимо от размеров;
- не удается установить причину лимфаденопатии с помощью клинического обследования пациента;
- наблюдение за больным и при необходимости лечение предполагаемого воспалительного процесса в течение 1–2 мес, обнаруживает несоответствие клинических проявлений основного заболевания и состояния лимфатических узлов (категорически недопустимо применение компрессов и физиопроцедур на область увеличенного лимфоузла!);
- явного подозрения на опухолевую природу лимфаденопатии, в частности, спаянность с кожей, клетчаткой, блокада лимфооттока, синдром сдавления.

Первичная морфологическая диагностика опухоли лимфатической системы должна основываться на гистологическом, цитологическом, иммунофенотипическом, иммуногистохимическом, кариологическом и молекулярном исследовании.

Материал для морфологического исследования лимфатического узла получают с помощью открытой эксцизионной биопсии. Открытую биопсию должен выполнять опытный хирург, который вместе с лечащим врачом определяет, какой лимфатический узел лучше иссечь для исследования. При наличии единственного увеличенного лимфоузла или конгломерата лимфоузлов, который может быть удален полностью, производится радикальная операция. В случае

генерализованной лимфаденопатии желательно биопсировать лимфоузел, появившийся первым. При наличии нескольких доступных биопсии лимфоузлов предпочтение должно быть отдано наиболее крупному и наиболее плотному из них, а при остальных равных условиях – раньше других появившемуся узлу, даже если это более сложно технически. Необходимо избегать частичных резекций, т.е. узел нужно удалять по возможности целиком. Следует иметь в виду, что мелкие лимфатические узлы, лежащие рядом с большим узлом часто обнаруживают реактивные изменения. Биопсия паховых (но не бедренных узлов) допустима в случае изолированной лимфаденопатии в этой области. Окончательное решение об объеме операции иногда принимается во время операции.

При опухолях полых органов (желудок, кишка), если раковая природа опухоли не доказана, а лимфатическая подозревается, недопустимы обширные резекции или экстирпация органов, так как это, в случае той или иной лимфомы, ведет к потере времени до начала химиотерапии, а последствия травматичных операций значительно снижают качество жизни больных, в то время как успехи современной химиотерапии значительно превосходят возможности хирургического лечения.

Пункционная биопсия нами используется редко, т.к. позволяет получить небольшой столбик ткани для цитологического и гистологического исследований, что может быть достаточным лишь для подтверждения рецидива или трансформации лимфомы у пациента с ранее установленным диагнозом. Применение тонкоигльной аспирационной биопсии ограничено цитологической диагностикой метастазов рака в лимфатические узлы и получением материала для микробиологического и вирусологического исследований при инфекционных процессах. При первичном исследовании увеличенного лимфоузла пункционная и аспирационная биопсия для диагностики не допустима.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА

Приготовление цитологических препаратов

Отпечатки получают со свежих разрезов биоптата и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Для иммунохимического исследования отпечатков ткани в практике пока протоколов не существует.

Методика приготовления гистологических препаратов и иммуногистохимических исследо-

ваний подробно изложена в книге Ю.А. Криволапова, Е.Е. Леенман «Морфологическая диагностика лимфом», изданной в Санкт-Петербурге в 2006 г.

Приготовление гистологических препаратов

Стандартная техника – фиксация в формалине и последующая заливка в парафин (синте-

тическая среда). Срезы ткани получают на микротоме толщиной 3–7 мкм. Для морфологических исследований – окраска гематоксилином-эозином, лучше – окраска азур-эозином (модификация метода Гимза).

Быстрозамороженные срезы – свежие образцы замораживают в переохлажденном изопентане или другом низкокипящем инертном веществе. Срезы ткани получают на криостате. Затем – быстрая фиксация и окраска гематоксилином-эозином или азур-эозином.

Иммуногистохимическое исследование

Для парафиновых срезов толщиной не более 5 мкм проводят предварительное демаскирование антигена (при низком или высоком pH – в соответствии с рекомендациями для каждого клона антител) и последующее выявление антигена пероксидазным, фосфатазным или флюоресцентным методом. Для замороженных срезов проводят выявление антигена пероксидазным, фосфатазным или флюоресцентным методом. Необходимо отметить, что клоны антител для работы на парафиновых и замороженных срезах могут отличаться.

Исследование методом проточной флюориметрии

Для достоверной диагностики лимфопролиферативных заболеваний в большинстве случаев необходимо определение иммунофенотипа опухолевых клеток. По наличию или отсутствию специфических антигенов можно определить линейную принадлежность клеток (В-клетки, Т-клетки, НК-клетки), а также установить степень их созревания (уровень дифференцировки). Иммунофенотип определяют с помощью иммунохимического исследования. В простейшем виде данный метод сводится к тому, что суспензию живых клеток инкубируют с моноклональными антителами против интересующих антигенов. Антитела конъюгированы с флюоресцентными красителями (FITC, Phycoerythrin, Cy-5), благодаря которым клетки, несущие искомым антиген, начинают флюоресцировать. Готовая нефиксированная суспензия клеток может храниться в холодильнике до 24 ч, а фиксированная – до одной недели.

Существует несколько способов регистрации флюоресценции. Первый способ (визуальный) состоит в использовании люминесцентного микроскопа (Р.С. Самойлова), другой – в применении метода проточной флюориметрии. Метод проточной флюориметрии основан на анализе интенсивности флюоресценции клеток, которые движутся в ламинарном потоке жид-

кости, просвечиваемом лучом лазера. Он дает менее детальную характеристику для каждой отдельной клетки, чем люминесцентная микроскопия, но благодаря высокой производительности позволяет получить качественную и количественную характеристику не только всей клеточной популяции, но и каждой отдельной субпопуляции.

Измерения ведутся в автоматическом режиме со скоростью 100–10000 событий (клеток) в сек. В результате за несколько минут накапливаются данные о десятках тысяч клеток. Эти результаты сохраняются в памяти компьютера в форме таблицы распределений и представляются на экране в виде графиков. Диагностическое заключение по результатам проточной флюориметрии формируется в результате анализа полученных распределений. Наиболее простой подход сохранился со времен микроскопического анализа и заключается в вычислении процента положительных клеток. Существуют и более детальные методы, основанные на применении кластерного анализа.

Как уже упоминалось, при большинстве новообразований лимфатической системы опухолевые клетки не несут никаких специальных маркеров, которые отличали бы их от клеток нормальных. Поэтому опухолевые клетки распознаются по сочетанию тех или иных признаков. Поскольку проточный флюориметр позволяет получить до 5–6 характеристик одной клетки (прямое и боковое светорассеяние, а также 3–4 флюоресцентных сигнала), то он дает большие возможности для идентификации опухоли. Опухолевые клетки могут быть выделены по необычному сочетанию светорассеяния и экспрессии определенных маркеров. Например, клетки, обладающие светорассеянием, характерным для лимфоцитов, но несущие ранний дифференцировочный антиген CD34 или TdT, определенно указывают на острый лейкоз. В случае лимфатических опухолей, как правило, встречаются опухолевые клетки, которые одновременно несут маркеры, в норме экспрессирующиеся на разных лимфоцитах. Например, хронические лимфолейкозы характеризуются коэкспрессией маркера В-клеток (CD19) и маркера Т-клеток (CD5). Более подробная характеристика опухолей лимфатической системы проводится на основании анализа значительного числа маркеров (как правило – около 10–15).

Еще одна важная характеристика опухоли – ее клональность. Поскольку в норме лимфоциты представлены множеством клонов, то обнаружение резкого преобладания одного клона над всеми остальными в подавляющем большинстве

случаев указывает на опухоль. В пользу предположения о клональности В-клеток говорит дисбаланс в экспрессии двух вариантов легких цепей иммуноглобулинов – κ - и λ -. В норме количество клеток, несущих κ -цепь, примерно равно количеству клеток, несущих λ -цепь. Грубое изменение этого соотношения, например, случаи, когда 60% клеток экспрессирует κ -цепи, и только 2% клеток – λ -цепи, 38% – не несут ни одного из маркеров, дает основание думать о моноклональности данной популяции лимфоцитов. Для Т-клеток установление клональности проводится, как правило, не на проточном флуориметре, а по анализу молекулярной массы Т-клеточного рецептора с помощью блоттинга по Саузерну.

Наконец, проточная флуориметрия позволяет оценить интенсивность размножения (пролиферативный индекс) опухолевых клеток. В нормальной крови размножающихся клеток практически нет (среди лимфоцитов – менее 0,3%). В лимфоузле размножающихся клеток больше (до 5%), и еще больше их в костном мозге (30–40%). Поэтому обнаружение пролиферирующих клеток в крови указывает на агрессивное течение опухоли. Оценка пролиферативного индекса отдельно для В-клеток и Т-клеток в лимфоузле и в костном мозге важна для выбора тактики лечения. Например, высокий уровень пролиферации В-клеток характерен для лимфомы Беркитта.

Цитогенетические методы исследования

Цитогенетическое исследование является неотъемлемой частью обследования больных лимфатическими опухолями. Одни заболевания имеют цитогенетические маркеры – специфические диагностические хромосомные нарушения, при других есть ряд наиболее часто встречающихся аберраций, позволяющих уточнить вариант заболевания и определить его прогноз.

Основными методами являются стандартное цитогенетическое исследование с дифференциальной окраской хромосом, при котором анализируется весь кариотип, и флуоресцентная гибридизация *in situ* (Fluorescence in situ hybridization, FISH) (рис. 33), при которой ведется прицельный поиск определенных хромосомных нарушений. Стандартное цитогенетическое исследование не всегда бывает успешным, так как клетки большинства зрелоклеточных лимфатических опухолей имеют низкую митотическую активность, и митозы могут отсутствовать. Кариотип в большинстве случаев лимфом характеризуется наличием множества клональных перестроек хромосом, что затрудняет интерпре-

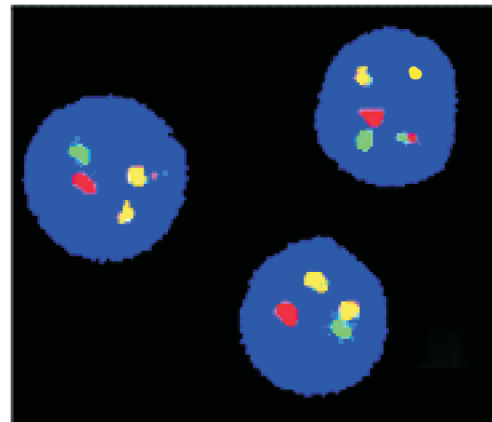


Рис. 33. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (Fluorescence in situ hybridization, FISH).

Во всех ядрах выявляется два желтых (слитных) сигнала, свидетельствующих о наличии транслокации $t(8;14)(q24;q32)$, диагностической для лимфомы Беркитта.

тацию результатов цитогенетического исследования. FISH не требует наличия делящихся клеток, позволяет выявлять мелкие (субмикроскопические) нарушения и идентифицировать сложные хромосомные перестройки. Кроме того, при отсутствии свежего биопсийного материала для исследования FISH может быть выполнена на цитологических препаратах и на гистологических срезах с парафиновых блоков, что позволяет проводить ретроспективную диагностику.

Диагностическими для **лимфомы Беркитта** являются транслокации с вовлечением локуса гена *c-MYC/8q24*. В 80% случаев выявляется $t(8;14)(q24;q32)$ – перемещение протоонкогена *c-MYC* в локус генов тяжелых цепей иммуноглобулина (IgH) $14q32$ (рис. 34), в 20% – варианты транслокации $t(2;8)(p12;q24)$ и $t(8;22)(q24;q11)$ – перемещение *c-MYC* в локусы генов легких цепей (IgK и IgL) [1].

Цитогенетический маркер **лимфомы из клеток мантийной зоны** (100% случаев) – транслокация $t(11;14)(q13;q32)$ – перестройка локусов протоонкогена *BCL-1 (CCND1)/11q13* и генов IgH/ $14q32$ (рис. 35) [2].

Диагностической для фолликулярной лимфомы является транслокация $t(14;18)(q32;q21)$ (рис. 36) или ее значительно более редкие варианты $t(2;18)(p12;q21)$ и $t(18;22)(q21;q11)$ – перестройки локуса гена *BCL-2/18q21* и локусов генов тяжелых или легких цепей IgH. Случаи диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомы с транслокацией $t(14;18)(q32;q21)$, вероятно, представлены крупноклеточной саркомной трансформацией фолликулярной лимфомы [3].

В части случаев **диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомы** (30–40% в Европе и

США, у нас при нодальной ДВККЛ менее чем в 10%) встречаются специфические транслокации с вовлечением локуса гена BCL-6 (3q27). При перестройках 3q27 ген BCL-6 может перемещаться как в локусы генов тяжелых и легких цепей IgH, так и в другие локусы, не связанные с генами иммуноглобулинов [4].

Транслокация $t(11;18)(q21;q21)$ выявляется 25–50% случаев **экстранодальных зрелоклеточных лимфатических опухолей** (желудка, легких, реже слюнной железы и орбиты). При этой транслокации происходит перестройка гена API-2/11q21 и гена MLT (МАЛТ-Лимфома-ассоциированная Транслокация)/18q21, с образованием химерного транскрипта API-2-MLT. Транслокация $t(11;18)(q21;q21)$ не встречается при лимфоцитах селезенки и лимфоузла и других лимфатических опухолях и выявляется только при экстра nodальных зрелоклеточных лимфомах [5].

В 90% случаев **Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза** выявляются перестройки локуса генов Т-клеточного рецептора TCR- α /d/14q11 с протоонкогенами TCL11/4q32.1 или MTCP1/Xq28 – инверсия $inv(14)(q11q32)$ (рис.

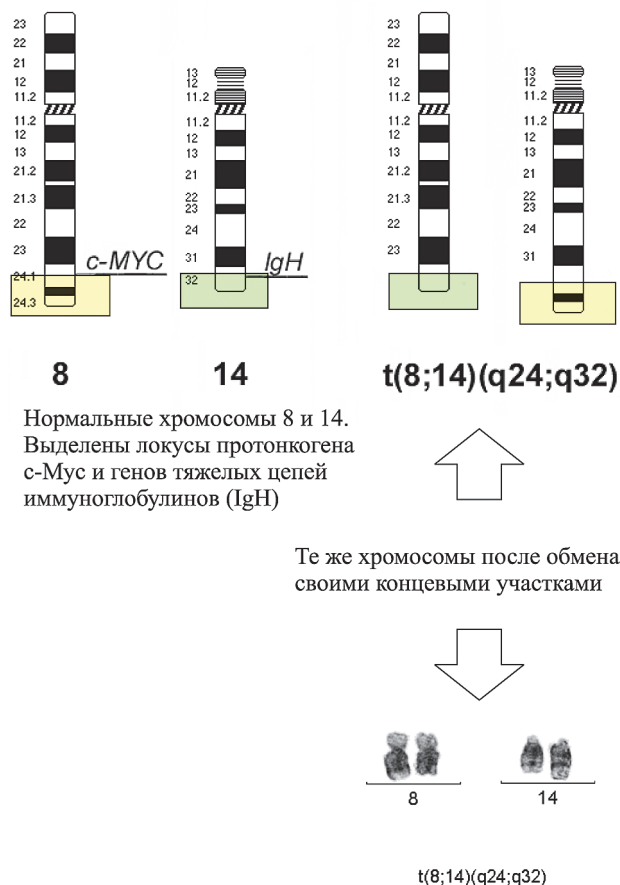


Рис. 34. Транслокация $t(8;14)(q24;q32)$, патогномоничная для лимфомы Беркитта.

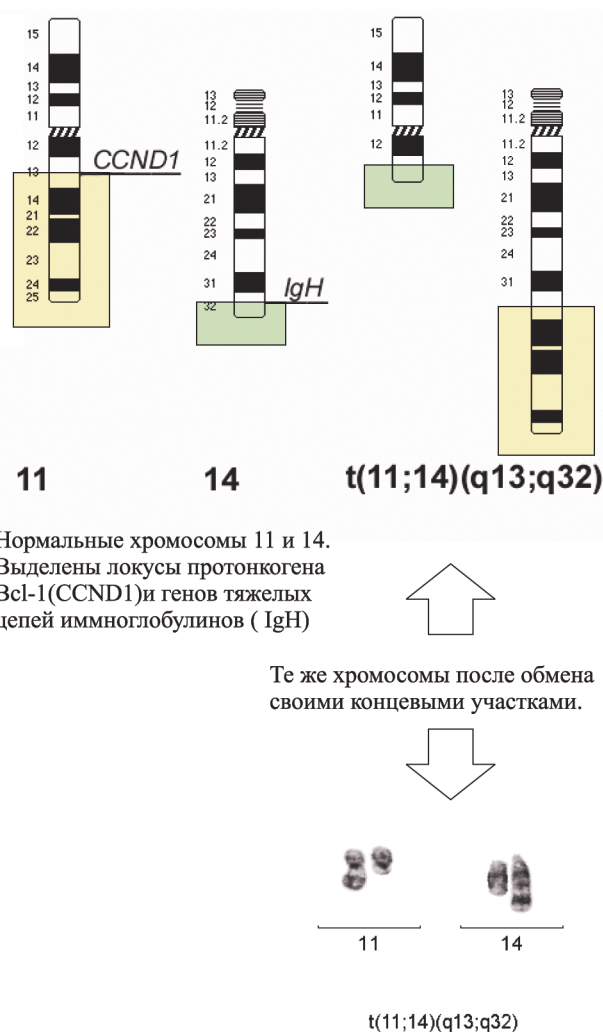


Рис. 35. Транслокация $t(11;14)(q13;q32)$, характерная для лимфомы из клеток мантийной зоны.

35), реже – транслокации $t(14;14)(q11;q32)$ и $t(X;14)(q28;q11)$. В большинстве случаев перестройки TCR- α /d сочетаются с аномалиями хромосомы 8 – изохромосомой $i(8)(q10)$, транслокацией $t(8;8)(p11;q12)$ или трисомией 8 [6].

В 60% случаев **анаплазированной крупноклеточной лимфосаркомы** выявляются перестройки локуса гена ALK/2p23, которые в 75% представлены транслокацией $t(2;5)(p23;q35)$ – перестройкой ALK с локусом гена NPM/5q35 с образованием химерного гена NPM-ALK. Среди вариантных перестроек ALK чаще других встречаются транслокации $t(1;2)(q25;p23)$, $t(2;3)(p23;q21)$ и инверсия $inv(2)(p23;q35)$. Перестройки ALK/2p23 не встречаются при других опухолях и являются диагностическими для анаплазированной крупноклеточной лимфосаркомы.

Для **хронического В-клеточного лимфолейкоза** не существует единого цитогенетичес-

кого маркера, есть ряд наиболее часто встречающихся aberrаций – делеции $\text{del}(13)(q14)$ (25–50% случаев), $\text{del}(11)(q23)$ – (20%), $\text{del}(17)(p13)$ (5–10%) и трисомия хромосомы 12 (10–25% случаев). В-ХЛЛ с делецией $13q14$ – единственной aberrацией в кариотипе характеризуется благоприятным течением заболевания. Делеция $11q23$ – локуса гена *ATM* – является основным цитогенетическим признаком опухолевой формы В-ХЛЛ, и так же, как и трисомия 12, относится к факторам промежуточного прогноза заболевания. Делеция $17p13$ – локуса гена *p53* – неблагоприятный прогностический признак; у больных с этим хромосомным нарушением наблюдается низкая общая выживаемость и резистентность к химиотерапии [7].

Основными цитогенетическими характеристиками **множественной миеломы** являются транслокации с вовлечением локуса генов Ig/14q32 (50–75%) и моносомия хромосомы 13 или

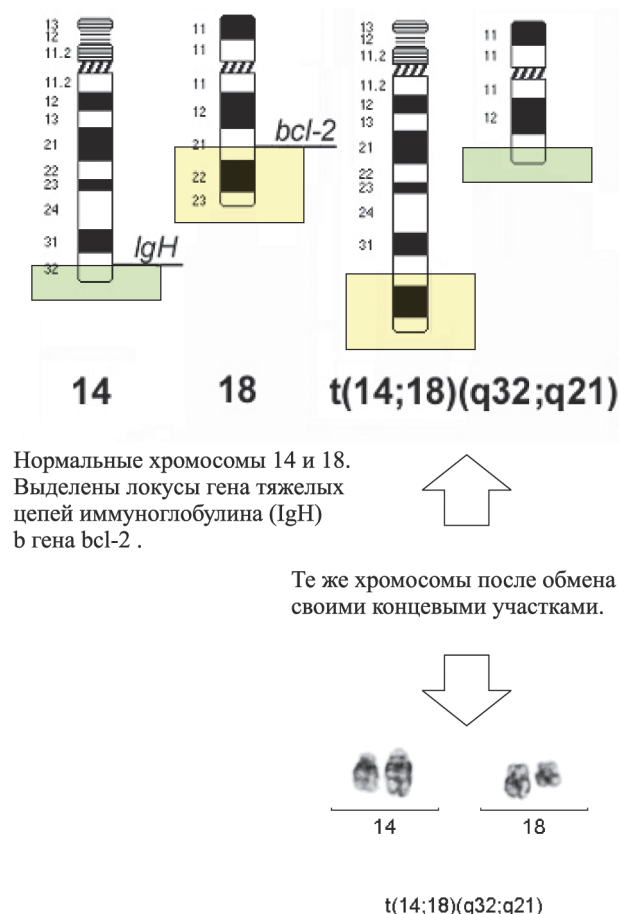


Рис. 36. Транслокация t(14;18)(q32;q21) – цитогенетический маркер фолликулярной лимфомы.

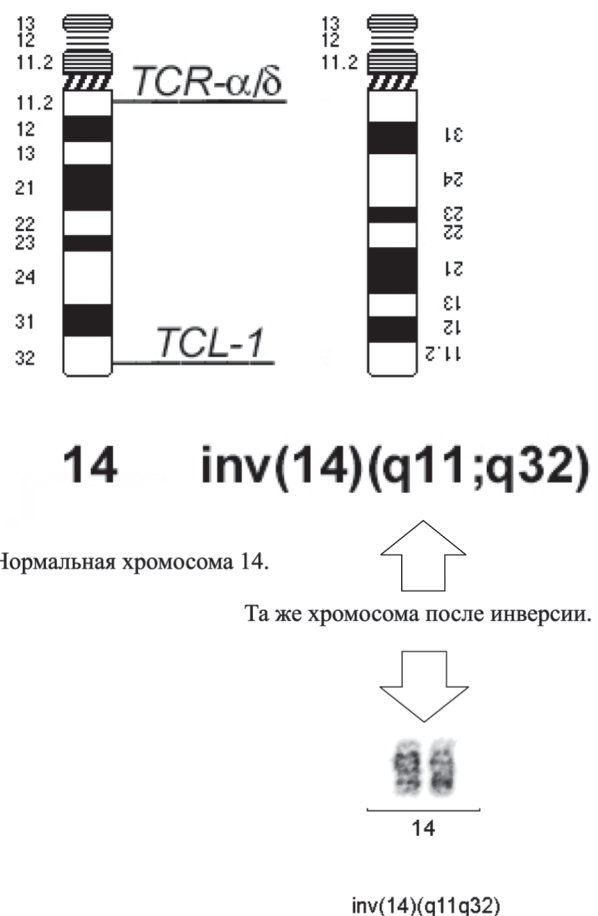


Рис. 37. Инверсия inv(14)(q11q32), часто встречающаяся при Т-пролимфоцитарном лейкозе.

делеция del(13)(q14) (35–50%). Транслокация t(11;14)(q13;q32) встречается в 15–30% случаев и является благоприятным прогностическим признаком. Для случаев с t(11;14) характерны G-тип секрети, низкий уровень сывороточного парапротеина, β_2 -микроглобулина, СРБ, более длительная общая выживаемость. Моносомия 13/делеция 13q14 является фактором промежуточного прогноза заболевания, преобладает А-тип секрети, характерны более высокий уровень СРБ, меньшая медиана выживаемости, резистентность к химиотерапии, в том числе высокодозной химиотерапии и трансплантации периферических стволовых клеток. Крайне неблагоприятными прогностическими факторами являются транслокации t(4;14)(p16;q32) (10–20%) и t(14;16)(q32;q23) (2–10%). Характерны III стадия, хроническая почечная недостаточность, А-тип секрети, низкие показатели гемоглобина и тромбоцитов, высокие уровни в 2-микроглобулина и крайне высокая летальность [8].

Молекулярно-биологические методы в диагностике лимфатических опухолей

Молекулярно-биологические методы прочно вошли в диагностическую практику современной онкогематологии. Это объясняется несколькими факторами. Во-первых, выявлен целый ряд генетических маркеров, характерных для той или иной опухоли. Так, хорошо известны транслокация t(11;14) с гиперэкспрессией циклина D1 при лимфоме из клеток мантийной зоны, транслокация t(14;18) с гиперэкспрессией bcl-2 при фолликулярной лимфоме, транслокация t(2;5) при анаплазированной лимфосаркоме, транслокации с участием гена с-тус при лимфоме Беркитта. Число вновь открываемых онкогенов стремительно растет. Выявление типичного генетического маркера опухоли может служить диагностическим целям.

Во-вторых, в диагностике лимфатических опухолей широко используется оценка клональности. Эта возможность обусловлена тем, что в каждом лимфоците имеются совершенно уникальные участки ДНК – вариабельные регионы иммуноглобулинов или Т-клеточных рецепторов. Поскольку опухоль возникает из одной клетки, накопление клеток с одинаковым вариабельным регионом свидетельствует о клональности.

В последние годы большое значение приобрел детальный анализ генов иммуноглобулинов при В-клеточных опухолях. Оценка мутационного статуса генов иммуноглобулинов имеет прогностическое значение при В-клеточном хроническом лимфолейкозе. Благодаря анализу V-D-J регионов клеток, выделенных микроманипулятором из опухолевой ткани, было установлено В-клеточное происхождение клеток Березовского-Штернберга. В случае развития двух лимфатических опухолей у одного больного или появления одной на фоне другой (синдром Рихтера) можно установить клональную связь между ними.

Наконец, гемобластозы, как правило, исходно диссеминированы и характеризуются поражением крови и костного мозга. Это дает возможность оценивать минимальную остаточную болезнь, используя относительно легко доступный материал. Маркерами для отслеживания минимальной остаточной болезни могут быть транслокации или клональные перестройки генов антигенных рецепторов.

Таким образом, молекулярные методы в онкогематологии применяются:

1. Для установления диагноза по специфическим генетическим нарушениям и клональности.

2. Для оценки прогноза (и подбора терапии в ряде случаев).

3. Для слежения за минимальной остаточной болезнью.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод, который позволяет выявить и синтезировать фрагменты ДНК из огромного количества геномной ДНК, содержащейся в клетке. Иными словами, с помощью ПЦР можно найти в испытуемом образце относительно короткий участок нуклеиновой кислоты и многократно размножить его. Основу метода составляет естественный процесс репликации (воспроизведения) ДНК. Во время репликации происходит расплетание двойной спирали ДНК и достраивание нуклеотидов во вторую цепочку по принципу комплементарности (соответствия). Достраивание второй цепи начинается в определенных местах – коротких двуцепочечных фрагментах, или местах прикрепления праймера («затравки»): ДНК-полимеразы, катализирующие репликацию ДНК распознают именно эти участки. Праймеры – это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, или олигонуклеотиды, которые присоединяются к нужным районам ДНК по принципу комплементарности. Подобрав соответствующие праймеры, можно многократно размножить (амплифицировать) строго определенный участок.

Разработка ПЦР позволила широко применять молекулярные методы в практическом здравоохранении и смежных областях. ПЦР применяется для выявления транслокаций, для оценки клональности, для оценки минимальной остаточной болезни.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет количественно оценить число исходных копий ДНК, или кДНК, в образце и обладает наибольшей специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью. ПЦР-РВ основана на оценке уровня флуоресцентного сигнала, накапливающегося во время ПЦР (то есть в реальном времени), и этим принципиально отличается от детекции результатов в геле, когда собственно ПЦР уже завершена. Существует несколько модификаций ПЦР-РВ. Чаще всего применяется ПЦР-РВ с использованием TaqMan зондов. При этом проводят обычную ПЦР, в которую помимо двух праймеров вводится еще один меченый олигонуклеотидный внутренний зонд, комплементарный внутренней части ПЦР продукта (какому-то району между праймерами). Зонды представляют собой олигонуклеотиды, которые связаны на одном конце с флуоресцентным красителем, а на другом конце с гасите-

лем флюоресценции. Находясь в непосредственной близости от гасителя, FAM при действии на него света передает энергию ему. Непосредственная близость флюоресцирующего вещества и гасителя делает зонд нефлюоресцирующим. Во время полимеразной цепной реакции зонд расщепляется и, таким образом, флюоресцирующее вещество высвобождается из-под влияния гасителя, поскольку уже не находится в непосредственной близости от него. Во время ПЦР-РВ в каждом цикле измеряется флюоресцентный сигнал, накопление которого соответствует накапливающемуся ПЦР-продукту. Таким образом, усиление сигнала в каждом цикле происходит пропорционально накоплению ПЦР-продукта. Регистрируя величину флюоресцентного сигнала в каждом цикле, можно определить время экспоненциальной фазы, которое коррелирует с исходным количеством копий в образце. Чем меньше копий мишени имеется в образце, тем позднее начнется значимый прирост флюоресцентного сигнала. По сравнению с обычной ПЦР, ПЦР-РВ обладает громадным диапазоном измерения числа копий исходной мишени. ПЦР-РВ в настоящее время широко применяется для оценки минимальной остаточной болезни и оценки прогноза.

Микрочипы. До последнего времени в реальном времени можно было измерять экспрессию одного или нескольких генов. Однако сегодня разработан более современный высокотехнологичный подход, основанный на технологии биологических микрочипов, позволяющих одновременно анализировать уровни экспрессии десятков тысяч генов в одном эксперименте.

Технология микрочипов позволяет организовать упорядоченную посадку большого числа различающихся фрагментов ДНК на каком-либо твердом носителе (нейлоновая мембрана, стекло), благодаря чему можно подвергать все исследуемые фрагменты ДНК одновременной гибридизации с меченой ДНК- (или РНК-) пробой. «Экспрессионный анализ» подразумевает одновременную гибридизацию тысяч тщательно аннотированных ген-специфичных образцов ДНК, упорядоченным образом организованных в пределах чипа, с радиоактивно- или флюоресцентно-меченой мРНК, выделенной из биологического образца.

Несмотря на то, что экспрессионный анализ с помощью микрочипов появился как исследовательский метод относительно недавно, уже получены результаты, которые позволили существенно изменить представления о патогенезе многих опухолей. Одна из наиболее важных це-

лей экспрессионного анализа с помощью микрочипов состоит в том, чтобы с помощью молекулярных характеристик вычленять гомогенные нозологические формы. Подразумевается, что в пределах гомогенной нозологической формы все образцы данной опухоли возникли из одной и той же популяции клеток, развивались по тому же патогенетическому механизму, в них активированы одинаковые сигнальные пути и они обладают сходной чувствительностью к токсинам. Микрочипы уже позволили значительно прояснить гетерогенность лимфатических опухолей. Так, в пределах В-крупноклеточной лимфомы идентифицировано 2 варианта болезни, получивших название герминальный и активированный [1]. Показано, что первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома радикально отличается по профилю экспрессии от В-ККЛ и напоминает лимфогранулематоз [2]. Показано, что при лимфоме из клеток мантийной зоны ведущим патогенетическим звеном является нарушение клеточного цикла и разработан способ оценки пролиферативной активности опухоли, дискриминирующий прогностически разные варианты [3]. При В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) определены молекулярные предикторы, точно классифицирующие пациентов в ту или иную прогностическую группу [4]. При Т-клеточном ОЛЛ показано, что aberrантная экспрессия ключевых транскрипционных факторов является центральным патогенетическим механизмом этой болезни; профиль экспрессии генов соотнесен с определенными стадиями Т-клеточной дифференцировки; показано, что гиперэкспрессия NOX11 идентифицирует отдельную прогностическую подгруппу в пределах Т-ОЛЛ [5]. В пределах миеломной болезни микрочипы позволили выявить 4 молекулярных варианта, различающихся по клиническому течению [6]. Проведена корреляция вариантов множественной миеломы со стадиями созревания плазматических клеток [7].

Анализ опухолей с помощью микрочипов, по видимому, войдет в рутинную клиническую практику. Вполне возможно, что существенная часть информации, получаемой с помощью микрочипов, может быть выявлена с помощью иммуногистохимии или проточной цитофлюориметрии. Однако список генов, экспрессионный уровень которых имеет клиническое значение при различных опухолях, быстро растет. Только микрочипы позволяют в реальном времени исследовать экспрессионный уровень десятков тысяч генов. Ни одна существующая в настоящее время методика даже не приближается к этому.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИ-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ СОПОСТАВЛЕНИЯ

Цитологически-гистологические сопоставления, конечно, лучше всего проводить одними глазами, или, по крайней мере при совместном обсуждении разных специалистов. Надежды на то, что «выручит» хромосомный или ПЦР анализ, или иммуногистохимия, или какой-то сверх авторитетный консультант, далеко не всегда оправдываются. Дело в том, что у цитологического анализа надежного «конкурента» в списке подсобных исследований очень часто нет, хотя, безусловно, главенствующую диагностическую роль в огромном большинстве случаев лимфатических опухолей играет гистологический, а не цитологический анализ. Именно поэтому пункционная первичная диагностика лимфатических опухолей не должна иметь места.

Последовательность диагностического поиска при подозрении на опухоль лимфатической системы такова.

1. При отсутствии какого-либо инфекционного процесса ощупыванием или с помощью методов лучевой диагностики обнаружен подозрительный лимфоузел или иное образование, появление которого, по мнению врача, не может быть объяснено реакцией на острое воспаление. Значит нужно провести морфологическое определение характера процесса, нужна биопсия этого образования.
2. Составляется план проведения всех необходимых исследований для того, чтобы сразу после удаления подозрительной ткани все специалисты, участвующие в ее анализе, сами забирали материал для своих анализов.
3. При биопсии готовятся препараты для гистологического исследования и отпечатки для цитологии – одновременно и обязательно из одной и той же ткани. Это относится и ко всем другим исследованиям.

Если удалено несколько образований (лимфоузлов), то каждое из них подлежит отдельной маркировке и размещению срезов на разных стеклах! Несоблюдение этого правила приводит иногда к полному разночтению между цитологическим и гистологическим исследованиями. Поскольку «удельный вес» в разбираемой группе опухолей у гистологии больше, то

реактивная картина в гистологическом препарате, и опухолевая картина в цитологическом может склонить диагноз в пользу реактивного процесса там, где на самом деле – опухоль. Источник трагической ошибки (далеко не редкой в самых квалифицированных лабораториях!) может оказаться в исследовании разных материалов: в одну лабораторию пошла опухоль, а в другую – располагавшийся вплотную к ней воспалительный узел.

В огромном большинстве случаев ответ на вопрос: опухоль или не опухоль в биопсированном материале, дает гистологически-цитологический анализ. А вот в определении характера опухоли без иммуофенотипирования, как правило, обойтись нельзя.

Поскольку все последующие исследования призваны либо подтвердить, либо опровергнуть первоначальное предположение, важную роль играет понимание клиницистами пределов достоверности той или иной методики в конкретной ситуации. Проиллюстрируем это утверждение примерами.

Известно, что морфология фолликулярных лимфом на гистологических препаратах может напоминать таковую при фолликулярной лимфоидной гиперплазии, вызванной инфекцией или аутоиммунным процессом (опухолевый фолликул, прежде всего его центр размножения, похож на реактивный). В этих случаях поставить диагноз помогают иммуногистохимический анализ с антителами к белку bcl-2 (яркая положительная реакция В-клеток центров фолликулов) и обнаружение транслокации t(14;18)(q32;q21). В пользу опухоли свидетельствует и экспрессия В-клетками центров фолликулов легких цепей иммуноглобулинов одного типа (к- или l-). Вместе с тем доказательства клональной природы лимфоидной пролиферации, полученные с помощью иммунохимического исследования с антителами к легким цепям иммуноглобулинов, не позволяют отличить лимфоцитому желудка от реактивной лимфоидной гиперплазии в слизистой, вызванной *Helicobacter pylori*. В этом случае наиболее достоверную информацию дают иммуногистохимический анализ, а также молекулярно-биологические и цитогенетические исследования.

ОПИСАНИЕ ОТПЕЧАТКОВ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

Для достоверного описания отпечатков лимфоидных органов необходимо найти тонкое ме-

сто. В идеальном случае все клетки, включая эритроциты, должны лежать отдельно (т. е. не

наслаиваясь и не соприкасаясь друг с другом). Это условие не всегда выполнимо, поскольку, в отличие от мазков крови, даже в качественно приготовленных отпечатках таких участков либо крайне мало, либо в них отсутствуют диагностические клетки.

Клеточный состав лимфоидных органов изучают в отпечатке, а не в мазке, так как приготовить мазок по аналогии с кровью и костным мозгом не удастся – клетки разрушаются или образуют толстые скопления. В отпечатке также могут быть грубые толстые скопления клеток, анализировать которые невозможно. Для исследования выбирают место, где клетки более или менее распластаны, где видны их границы и структура ядер.

В отпечатке нормального лимфоузла основную массу составляют лимфоциты и пролимфоциты. Их процентное соотношение не имеет большого диагностического значения, но чаще преобладают зрелые лимфоциты. Несколько процентов клеток составляют иммунобласты. При реактивных лимфаденитах иммунобластов может быть много – 10 и более процентов. Бластная структура ядер всегда очень настораживает морфолога. Поэтому И.А. Кассирский часто говорил о нежелательности пункции или биопсии лимфоузла при инфекционном мононуклеозе, так как обнаружение десятков процентов бластов – иммунобластов в отпечатке может вызвать подозрение на лимфосаркому. Реактивная природа иммунобластов доказывается отсутствием признаков атипизма и полиморфизма: клетки и их ядра имеют правильную круглую или овальную форму, мало различаются по размерам, но варьируют по степени синевы цитоплазмы – от светло-светло голубой, до темно-синей. Ядрышки – одно–два – мелкие, правильной формы. Макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, плазматические клетки почти всегда встречаются в отпечатке неопуховатого узла в количестве единичных элементов.

Значительные трудности для диагностики представляют собой отпечатки лимфатических органов при лимфатических опухолях, когда собственно опухолевые клетки составляют небольшую часть от общей массы реактивных элементов. Так бывает при лимфогранулематозе, когда на фоне зрелых лимфоцитов, Т-клеточной природы, реактивных, найти диагностическую клетку Березовского-Штернберга очень трудно. Так бывает при центрофолликулярной лимфоме в начале процесса, когда атипичные клетки единичны в нескольких полях зрения. В таких случаях морфолог должен дать лишь подробное протокольное описание препарата, предоставив «диагностическое слово» гистологическому, иммунохимическому исследованиям. Обнаружение даже единичных, но явно атипичных клеток в отпечатке должно быть описано и сопоставлено с гистологической картиной для создания «словесного портрета» патологии. Однако и такой подход иногда не приводит к установлению нозологической формы опухоли, хотя атипизм и полиморфизм отдельных клеток не оставляют сомнений в их опухолевой природе. В этих случаях на помощь приходят другие методы исследования, а изредка – повторная биопсия.

Отдельный вопрос – цитологическая характеристика патологических клеток, имеющих не бластную, а грубую лимфоидную структуру ядра. Их опухолевый атипизм проявляется в больших размерах, существенных различиях размеров этих клеток при более или менее одинаковой структуре ядра, наличии нуклеол, иногда – уродливых, часто – темно-синих на фоне грубой структуры хроматина.

При анализе опухолевых клеток очень важно выбрать в качестве эталона для сравнения нормальный зрелый лимфоцит с грубой – «горы и долины» – структурой ядра. Определенную помощь в установлении опухолевой природы клеток в отпечатке часто оказывает феномен **цитоплазмоклазии** – появление множества обрывков цитоплазмы саркомных клеток (рис. 38).

ОПИСАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Для гистологического исследования традиционно используют срезы, приготовленные из ткани, залитой в парафин, или срезы быстро замороженной ткани при условии, что их толщина (гистология 4 мкм), (иммуногистохимия 3 мкм). В более толстых срезах клетки располагаются не в один, а в несколько рядов, что мешает анализу тканевых и клеточных структур. При оценке размеров опухолевых клеток на гистологи-

ческих препаратах точкой отсчета являются ядра малых лимфоцитов. Клеточные элементы, ядра которых более чем в два–три раза крупнее ядер малых лимфоцитов, относят к категории **крупных клеток**, а те, которые больше в три–четыре раза, называют **гигантскими**. Лимфоидные клетки, чьи ядра больше, чем у малых лимфоцитов, но меньше, чем у крупных клеток, относят к элементам среднего размера. Изредка

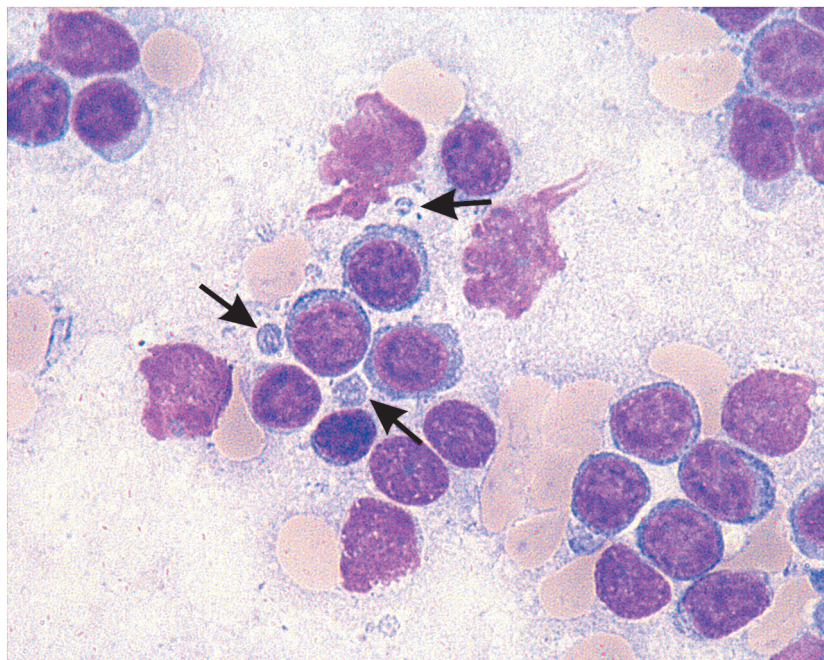


Рис. 38. Отпечаток лимфоузла (имм.).

Стрелками указаны обрывки цитоплазмы опухолевых клеток – феномен цитоплазматической клатации.

встречаются лимфосаркомы, при которых ядра опухолевых клеток не больше ядра малого лимфоцита. При их описании особенно важно обращать внимание на наличие, форму и цвет нуклеол, клеточный полиморфизм. И атипизм опухолевых клеток, и их полиморфизм в этих случаях лучше бывают видны в цитологическом препарате.

На гистологических срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, оценивается общее строение ткани, структура ее отдельных участков, характер опухолевого роста, а также клеточный состав. Опухолевые клетки могут равномерно замещать ткань лимфоузла (или другого органа) – **диффузный рост**, или образовывать скопления – **нодулярный рост**, или проникать между остатками нормальной ткани своеобразными тяжами – **интерстициальный рост**. Бывает и смешанный тип роста: **очагово-интерстициальный или диффузно-интерстициальный**. Но иногда, особенно на начальных этапах опухоли, может сохраняться нормальный вид фолликулов, опухоль располагается внутри них (центрофолликулярная лимфома).

Описывая гистологическую картину лимфатического узла, необходимо ответить на вопросы о состоянии оболочки узла, трабекулах, синусах, фолликулах, сохранности в них зон мантии и зародышевого центра, сосудов. Если структура лимфоузла нарушена, необходимо дать протокольное описание патологии, не заменяя его короткими диагностическими ярлыками (например, «диффузная крупноклеточная саркома», «лимфома Беркитта» и т.п.). Очень

важно давать описательную характеристику патологических клеток. Гигантские клетки Лангханса, Березовского-Штернберга, многоядерные клетки – макрофаги инородных тел должны быть описаны, а не просто названы.

Особенно важно протокольное описание клеток Березовского-Штернберга, поскольку бытующее отнесение к таковым различных многоядерных гигантских клеток под видом произвольно трактуемого понятия «варианта клеток» или «типа Березовского-Штернберга» обрекает больных на неправильную терапию.

Применительно к лимфатическим опухолям гистологическое заключение всегда носит синтетический характер. Учитывается общая гистологическая картина и результаты иммуногистохимии. Хотя по времени оба эти исследования могут быть и разорваны (совсем плохо, когда те и другие препараты смотрят разные глаза), заключение должно быть только общим по всей гистологической картине.

Несмотря на то, что иммуногистохимические исследования давно вошли в жизнь, они все еще очень далеки от стандартизации. Используются антитела разных фирм, разных разведений, в разных комбинациях. Ясно, что невозможно использовать сразу всю панель имеющихся антител. Это очень дорого и не имеет большого смысла. Выбор антител определяется клинической картиной и, конечно, исходным патогистологическим анализом. Но и в этом случае ошибки иммуногистохимии бывают достаточно часто. Перечислим некоторые типовые причины таких ошибок.

Пример 1.

Рисунок лимфоузла полностью стерт. Все поле зрения занято однотипными лимфоидными ядрами. Не найдя гранулем (а их было очень мало и очень мелких), не найдя клеток Березовского-Штернберга (их тоже было очень мало), и обнаружив Т-клеточный иммунофенотип основной клеточной массы, патолог написал диагноз «Т-клеточная злокачественная лимфома». Ошибка вскрылась после рецидива болезни по анализу новой биопсии и пересмотру старой: был обнаружен лимфогранулематоз.

Пример 2.

Рисунок лимфоузла полностью стерт, выраженный беспорядочный склероз, небольшие поля очень крупных, в том числе и многоядерных клеток с уродливыми ядрами, имеющими структурный и плотный хроматин, мелкие и более крупные уродливые нуклеолы. Среди гигантских отдельные клетки CD15 положительны, CD30 положительных нет.

Категорическое заключение «Лимфогранулематоз» будет неправильным, так как речь идет о грубо анаплазированной опухоли, первичная природа которой может быть различной. Это может быть и саркомная трансформация лимфогранулематоза (саркома Ходжкина с выраженным склерозом), и первичная грубо анаплазированная в результате прогрессии крупноклеточная саркома, протекавшая со склерозом. В пользу предположения о саркоме Ходжкина может говорить обнаружение крупных одноядерных клеток с большой нуклеолой, сопоставимой по своим размерам с ядром малого лимфоцита. Это – клетки Ходжкина.

Пример 3.

В трепанате костного мозга скопления лимфоцитов, по плотности ядер напоминающих эритрокариоты, имитируют красноклеточную опухоль, так как окрашенные при реакции на гликофорин эритроциты образуют плотное прилипание к лимфоцитам, границы цитоплазмы которых не видны. Такие же плохо разграничиваемые скопления могут касаться и дифференциации разных форм лимфоцитов, допустим, по маркерам CD20 и CD3.

Отдельного обсуждения заслуживают многочисленные воспалительные изменения в лимфоузлах, очень часто объединяемые универсальным понятием «реактивные изменения». Основная трудность в их нозологической расшифровке заключается в том, что при самых разных воспалительных процессах могут быть однотипные изменения гистологической картины. Кроме того, существует понятие «лимфаденит опухолевого узла». В этих случаях речь идет о воспалительной реакции лимфатической ткани в пораженном опухолью узле. Вопрос этот, хорошо известный клиницистам, практически не описан морфологами. В качестве примера приводим наблюдение больного N, страдавшего лимфогранулематозом. Первый биопсированный шейный лимфоузел демонстрировал полное сти-

рание его рисунка, наличие небольших гранул на фоне морфологически зрелых Т-лимфоцитов и эозинофилов, нейтрофилов. Гигантских клеток было очень мало, типичных с крупными нуклеолами не было. Отдельные гигантские клетки имели CD15 положительность, неярко выраженную. Просмотр препаратов многими исследователями разных учреждений сводился к предположению, но не к утверждению, о лимфогранулематозе. Больной высоко лихорадил. Периферических увеличенных лимфоузлов не было, но увеличивались размеры селезенки. Решено было сделать диагностическую спленэктомию. Одновременно произведена краевая биопсия печени и взят лимфоузел ворот селезенки. При гистологическом исследовании селезенки обнаружена убедительная картина лимфогранулематоза. Кроме того, были выявлены эпителиоидноклеточные скопления с наличием типичных клеток Пирогова-Лангханса. Очагов некроза, практически обязательных для туберкулеза, не было. Аналогичные гранулемы были обнаружены в печени, но без признаков лимфогранулематоза, и в лимфоузле. ПЦР реакция на туберкулез была положительной, но ее специфичность для 70-летнего пациента была невысока. После удаления селезенки температура нормализовалась. Состояние больного стало улучшаться. Патогистолог высказался в пользу туберкулезной природы эпителиоидноклеточных образований на фоне лимфогранулематоза. Однако их присутствие и в селезенке, и в лимфоузле, и в печени должно было бы говорить о генерализованном процессе. Это предположение решительно не согласовывалось с общей клинической картиной. Против туберкулезной природы этих бугорков говорило отсутствие некрозов во всех трех органах. От применения туберкулостатиков отказались. Проведено 6 курсов CVPP терапии с последующим облучением верхнего этажа и парааортальных узлов. Полная ремиссия сохраняется в течение более чем 5 лет.

Мы не можем дать описание всего набора реактивных изменений в лимфоузлах, селезенке. Но очень важно, учитывая относительную точность морфологического анализа, избегать категорических заключений в тех случаях, когда набор фактов позволяет говорить лишь о предположении. Невозможность поставить диагноз по биопсии при использовании всех вспомогательных исследований – достаточно частое явление. Сплошь и рядом для диагностики приходится либо биопсию повторять, либо прибегать к помощи отсрочки заключения при наблюдении за больным.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИМФОМ

Дифференциальная диагностика между нодальными В- и Т-клеточными лимфомами осуществляется только с помощью иммунохимического анализа.

Для крупноклеточных лимфом, фолликулярной лимфомы и лимфогранулематоза основным методом является иммуногистохимия, для зрелоклеточных (включая лимфому мантийной зоны) и Беркитт-подобной – предпочтительна проточная флюориметрия.

В ряде случаев для достоверной диагностики В-клеточной лимфомы необходимо установить клональность опухолевых клеток. Наиболее надежной методикой оценки клональности В-клеток является проточная флюориметрия.

Лимфогранулематоз

Включает два основных типа: классический лимфогранулематоз и нодулярное лимфоидное преобладание (парагранулема). Классический тип включает 4 основных варианта, и все они характеризуются присутствием гигантских многоядерных клеток Березовского-Штернберга и крупных одноклеточных клеток Ходжкина. Это клетки с широкой интенсивно розовой цитоплазмой, в ядрах присутствуют одиночные центрально расположенные крупные ядрышки. Опухолевые клетки коэкспрессируют CD30 и CD15 и негативны по антигену CD45. Иногда опухолевые клетки экспрессируют В-клеточные антигены CD20 и CD79a. Классический лимфогранулематоз:

1. Нодулярный склероз. Диагностика этого наиболее частого гистологического варианта лимфогранулематоза, как правило, несложна. В случаях синцитиального подварианта нодулярного склероза, характеризующегося обилием опухолевых клеток, может потребоваться дифференциальная диагностика с метастазами рака (инвазия краевого синуса, отсутствие экспрессии антигена CD45, позитивная окраска опухолевых клеток на цитокератины), а также с анаплазированной крупноклеточной лимфосаркомой (CD45+, ALK+).
2. Смешанноклеточный вариант. Характеризуется наличием эпителиоидно-клеточных гранул смешанного состава: эозинофилы, плазматциты, лимфоциты. Диагностические сложности при этом варианте могут возникать в случаях с выраженной гранулематозной реакцией, при которых может потребоваться дифференциальная диагностика с ре-

активными лимфаденитами различной этиологии.

3. Лимфогранулематоз, вариант лимфоцитарного обогащения. Характеризуется преобладанием лимфоцитов в окружении диагностических клеток. Дифференциальная диагностика с диффузным вариантом лимфоидного преобладания (парагранулемой).
4. Лимфоидное истощение. Типичные клетки Березовского-Штернберга чаще всего отсутствуют, а имеющиеся гигантские многоядерные клетки характеризуются выраженным полиморфизмом и морфологическим уродством. Характеризуется вытеснением лимфоидной ткани за счет преобладания атипичных клеток и склероза. Основное окружение – это гистиоциты и фибробласты. Дифференциальная диагностика с В- и Т-крупноклеточными лимфосаркомами с помощью линейно-специфичных маркеров.

Нодулярное лимфоидное преобладание (парагранулема). Характеризуется наличием крупных диагностических «попкорн-клеток», с лопастными ядрами и крупными ядрышками. Эти клетки несут на поверхности CD45 и маркеры В-лимфоцитов (CD20, CD79b). Окружение этих клеток представлено в виде нодулярных, редко диффузных лимфоидных пролифератов, состоящих из В-лимфоцитов. CD15 и CD30 в диагностических клетках отсутствуют.

ХЛЛ/лимфома из малых лимфоцитов

Рисунок лимфоузла полностью стерт. Опухоль представлена однотипными малыми лимфоцитами с округлым ядром, имеется небольшая примесь лимфоидных клеток с более светлыми ядрами среднего размера, содержащими одиночные крупные ядрышки. Опухоль коэкспрессирует антигены CD19/CD5/CD23 при отсутствии CD79b. Дифференциальная диагностика в сложных случаях проводится с лимфомой из клеток мантийной зоны (коэкспрессия CD79a/CD79b, отсутствие экспрессии CD23, в большинстве случаев выявляется гиперэкспрессия циклина D1), лимфоплазмочитарной лимфомой (наличие в клеточном составе опухоли плазматизированных лимфоцитов и плазматических клеток, CD5-, CD23-, наличие сильной экспрессии цитоплазматических иммуноглобулинов – обычно IgM), а также и с диффузной лимфомой из клеток центра фолликула (ядра опухолевых клеток имеют сложную форму, фенотип опухолевых В-клеток – CD23-, CD10+).

Лимфома из клеток мантийной зоны

Цитологически опухоль полиморфна. Выделяют три гистологических варианта опухоли: диффузный, нодулярный и мантийный. Диффузный тип характеризуется бесструктурной массой клеток угловатой формы (центроциты). Нодулярный вариант подразумевает наличие отграниченных нодулярных пролифератов центроцитов. Мантийный рост представляет собой множественные фолликулярные структуры, опухолевые клетки формируют утолщенную мантийную зону вокруг редуцированных центров размножения. По цитологическим признакам дополнительно выделяется бластоидный тип лимфомы из клеток мантийной зоны. Клетки при этом имеют светлые более крупные ядра. Дифференциальная диагностика с ХЛЛ/лимфомой из малых лимфоцитов по коэкспрессии CD79a/CD79b в отсутствие CD23. В большинстве случаев определяется гиперэкспрессия циклина-D1. Самый частый, диффузный вариант опухоли дифференцируют с диффузной лимфомой из клеток центра фолликула. Нодулярный и мантийный типы дифференцируют с фолликулярной лимфомой, при которой В-клетки CD10+, CD5-, CD23-, циклин-D1-. Дифференциальная диагностика с лимфомой из клеток маргинальной зоны лимфоузлов и селезенки, при которой В-клетки CD10-, CD5-, CD23-, циклин-D1-. Бластоидный вариант опухоли чаще всего дифференцируют с лимфобластной лимфомой (при мантийной зоне не экспрессируются ранние маркеры) и лимфомой Беркитта, которая имеет существенно более высокий пролиферативный индекс.

Лимфомы из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы) лимфоузлов и селезенки

Цитологически – пролиферация зрелых лимфоидных клеток. Гистоморфология лимфомы из клеток маргинальной зоны разнообразна. В селезенке опухоль чаще всего представлена разнокалиберными очагами лимфоидной пролиферации. При наличии на срезе типичных вторичных фолликулов опухолевые клетки локализуются в их внешней (маргинальной) зоне. Клеточный состав лимфом из клеток маргинальной зоны однотипен, на гистологических срезах он представлен лимфоидными клетками с довольно широкой светлой цитоплазмой, более светлыми, чем у малых лимфоцитов ядрами (монотонными В-клетками). На проточном флуориметре диагностируется по клональности В-клеток и отсутствию аберрантной экспрессии маркеров на В-клетках.

Иммунологический профиль - CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, в то время как антигены CD5, CD23 и CD10 не экспрессируются.

Фолликулярная лимфома

В РФ встречается относительно редко. Цитологическая диагностика затруднена. Гистологически опухоль чаще всего представлена тесно расположенными нодулярными образованиями либо вторичными фолликулами с широкими центрами размножения. По проценту крупных клеток выделяют три градации фолликулярных лимфом – I, II и IIIa. По соображениям терапевтической целесообразности градация IIIb в настоящее время рассматривается в качестве нодулярного варианта крупноклеточной лимфомы. Дифференциальная диагностика I и II градаций с реактивными лимфаденитами проводится по экспрессии Bcl-2, CD10 и низкому уровню экспрессии Ki-67 на опухолевых клетках центров. В сложных случаях целесообразно подтверждение диагноза методом FISH. Дифференциальная диагностика с реактивной фолликулярной гиперплазией с помощью проточной флуориметрии может быть затруднена малым представительством опухолевых клеток, препятствующим определению клональности. Дифференциальная диагностика с лимфомой из клеток маргинальной зоны и лимфомой из клеток мантийной зоны базируется на совокупности гистологических признаков, морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток.

Лимфома Беркитта

Опухоль характеризуется мономорфной пролиферацией лимфоидных клеток среднего размера со светлыми ядрами. Характерный признак – обилие митозов и фагоцитирующих макрофагов, что создает картину «звездного неба» (непостоянный признак). Предпочтительным методом иммунохимического анализа является проточная флуориметрия. Индекс пролиферации при лимфоме Беркитта составляет не менее 90% (в полигоне мелких клеток). Характерна экспрессия CD10 на большинстве В-клеток. Лимфоме Беркитта чаще всего дифференцируют с В-лимфобластными лимфосаркомами и беркиттоподобными В-крупноклеточными лимфосаркомами (по отсутствию в них транслокации гена c-myc, выявляемой методом FISH).

Диффузная В-крупноклеточная лимфосаркома

Гистологически – рисунок лимфоузла, как правило, стерт. Встречаются многочисленные

очаги крупных клеток (по диаметру вдвое больше малого лимфоцита) со светлыми ядрами и отчетливыми ядрышками, количество которых варьируется от одиночных до множественных. Иногда опухолевые клетки образуют сплошной пласт. На срезах и на отпечатках могут присутствовать гигантские многоядерные клетки. Их основное отличие от Березовского-Штернберга заключается в структуре ядрышкового аппарата (в отличие от клеток Березовского-Штернберга ядрышки гигантских многоядерных клеток крупноклеточных лимфосарком множественные, мелкие). Иммунологический профиль диффузной В-крупноклеточной лимфосаркомы лишен черт специфичности (опухолевые клетки несут пан-В-клеточные антигены CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, которые могут коэкспрессироваться и с другими антигенами, в частности, с CD5, и CD10). Анализ на проточном флюориметре затруднен в случаях, когда опухоль имеет большую реактивную составляющую. Индекс пролиферации выше нормы (более 5% В-клеток лимфоузла с тенденцией к нарастанию индекса пролиферации среди крупных клеток). В отсутствие клональности В-клеток дифференциальная диагностика с лимфогранулематозом и анаплазированными крупноклеточными лимфосаркомками базируется на результатах иммуногистохимического исследования диагностических клеток.

Анаплазированные крупноклеточные лимфосаркомы

Примерно в половине случаев лимфоузел поражен лишь частично, а на остальном протяжении органа визуализируются нормальная ткань, в частности, реактивные фолликулы. Гистологический спектр опухоли чрезвычайно широк. В типичных случаях скопления опухолевых клеток обнаруживаются в растянутых синусах лимфоузла, иногда они рассеяны по всей площади среза или образуют сплошной пласт. Цитоморфология опухолевых клеток переменна, характеризуется выраженным полиморфизмом. В составе опухоли часто обнаруживаются гигантские клетки, в том числе и многоядерные. Опухолевые клетки экспрессируют CD45, CD30, ALK, часто также экспрессируется эпителиальный мембранный антиген (EMA). В подавляющем большинстве случаев опухолевые клетки экспрессируют пан-Т-клеточные антигены CD2, CD3, CD5, и CD7, однако отмечается выпадение одного или двух из них. Изредка встречается Т-0 вариант, при котором отсутствуют все Т-клеточные маркеры. Крупноклеточные анаплазированные

лимфосаркомы дифференцируют с другими В- и Т-клеточными лимфосаркомками (CD30-ALK-, EMA-), лимфогранулематозом (морфологически и иммуногистохимически – CD45- на опухолевых клетках) и метастазами рака (CD45-CD30-, ALK-, цитокератины+).

Группа периферических Т-клеточных лимфосарком

Группа редко встречающихся опухолей. Гистологически картина полиморфная, опухоль может поражать лишь часть органа. В пораженных лимфоузлах часто сохраняются фолликулы, окруженные широким валом Т-клеток, размеры которых варьируют от средних до крупных. Иммуногистохимическая диагностика затруднена. Диагноз устанавливается на проточном флюориметре на основании фенотипа лимфоцитов – преобладание Т-клеток с резко измененным хелперно-супрессорным соотношением (соотношение CD4+/CD8+ Т-клеток составляет более 3 или менее 1/3). При малом содержании CD4+ клеток необходимо исключить ВИЧ-инфекцию. Для большей части периферических Т-клеточных лимфосарком характерен аберрантный фенотип с выпадением экспрессии одного из Т-клеточных антигенов (поверхностный CD3, CD5, CD7) и/или коэкспрессией одного из В-клеточных антигенов (CD20). Часто диагноз можно подтвердить путем определения клональности Т-клеточного рецептора (методом ПЦР), впрочем, отсутствие клональности не противоречит диагнозу опухоли. Периферические Т-клеточные лимфосаркомы дифференцируют с крупноклеточными лимфосаркомками (в том числе, и с анаплазированными) в основном по отсутствию крупных клеток.

Ангиоиммунобластная лимфома

Ангиоиммунобластная лимфома относится к исключительно редким Т-клеточным опухолям. Предположение об этом заболевании строится на наличии нескольких гистологических признаков: диффузном стирании структуры лимфоузла с отсутствием фолликулов и облитерацией большинства синусов; наличии множественных, анастомозирующих друг с другом венул с высоким эндотелием; обилии и полиморфизме реактивной составляющей, включающей в себя Т-иммунобласты, плазматизированные лимфоциты, а также плазматциты, эозинофилы и активно фагоцитирующие макрофаги. Так же как и при других Т-клеточных лимфомах, на срезах могут обнаруживаться отдельные реактивные фолликулы. Опухолевая популяция, как

правило, представлена Т-клетками, размеры которых варьируются от мелких до средних. Возможна небольшая примесь гигантских многоядерных клеток. Характерна очаговая гиперплазия фолликулярных дендритических клеток вокруг сосудов, которую можно выявить только при иммуногистохимической окраске на CD21 и CD23. Опухолевые клетки при ангиоиммунобластной лимфоме экспрессируют CD4 и частично CD10, что помогает в дифференциальной диагностике с периферическими Т-клеточными лимфосаркомами и реактивными лимфаденитами.

Лимфатические опухоли с изолированным поражением средостения

Эта группа включает в себя лимфогранулематоз, В- и Т-клеточные лимфосаркомы, дифференциальная диагностика между которыми описана выше. Диагностика часто осложняется сложностями с получением информативного биопсийного материала. Основным методом

анализа лимфатических опухолей с изолированным поражением средостения является иммуногистохимия.

Другие экстранодальные лимфатические опухоли

В подавляющем большинстве случаев – неходжкинские лимфомы. Диагноз нередко затруднен из-за трудностей с получением информативного биопсийного материала. При наличии достаточного количества лимфоидных клеток в биоптате диагноз верифицируется, во-первых, по данным гистологии и, во-вторых, иммуногистохимии. Получение материала для проточной флуориметрии всегда целесообразно, но не всегда возможно технически. Поскольку большинство опухолей имеют В-клеточную природу, для уточнения диагноза, как правило, достаточно установления клональности В-клеток. В редких случаях преобладания Т-клеток диагноз опухоли может быть установлен по aberrантному фенотипу Т-клеток.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ

Клетки некоторых В-клеточных опухолей, как и их нормальные аналоги, обладают способностью к синтезу и секреции иммуноглобулинов (Ig). При этом в сыворотке крови и/или моче иммунохимическими методами выявляются структурно гомогенные Ig (синонимы: парапротеин (ПП), моноклональный Ig (MIg), патологический иммуноглобулин (PIg), М-белок, М-градиент, М-компонент). Идентичность строения таких Ig связана с их происхождением: они продуцируются В-лимфоцитами и/или плазмócитами одного клона. Молекулы моноклонального иммуноглобулина идентичны по классу тяжелых цепей (G, A, M, D, E), типу легких цепей (κ , λ) и организации V-области, определяющей в структурном отношении идиотип молекулы, а в функциональном – ее антителную специфичность. Наличие моноклональных Ig в сыворотке и/или моче определяется термином монокло-

нальная гаммапатия или моноклональная иммуноглобулинопатия. Моноклональная продукция может быть представлена как полными молекулами, так и их фрагментами (табл.1) [1].

Помимо структурных вариантов, моноклональная секреция может значительно варьировать по количеству продуцируемых Ig – от следового уровня до десятков грамм MIg на литр сыворотки и/или мочи. Как правило, высокий уровень секреции характерен для опухолей, клеточный субстрат которых представлен высокодифференцированными формами иммунопродуцентов (плазмócитами и лимфоплазмócитами). Прежде всего, это разные варианты парапротеинемических гемобластозов (миеломная болезнь и макроглобулинемия Вальденстрема).

Клиническое значение выявления и характеристики моноклональной секреции связано со

Таблица 1

Иммунохимическая характеристика моноклональной продукции

Вариант 1		Вариант 2	Вариант 3
Полные молекулы Ig:		Полные молекулы Ig	Фрагменты Ig:
IgG κ	IgG λ	и свободные моноклональные	свободные L-цепи (белок Бенс-
IgA κ	IgA λ	L(легкие)-цепи (белок Бенс-	Джонса κ или λ),
IgM κ	IgM λ	Джонса)	свободные H(тяжелые)-цепи (α ,
IgD κ	IgD λ	того же типа (κ или λ)	γ , μ)
IgE κ	IgE λ		

следующими обстоятельствами. Прежде всего, факт секреторной активности опухоли учитывается при нозологической характеристике лимфомы. Кроме того, определение уровня секреции в динамике помогает оценить течение заболевания и эффективность проводимой терапии. Необходимо упомянуть, что периодический контроль иммунохимических показателей является обязательным в группе пациентов с моноклональной гаммапатией неясного значения (*monoclonal gammopathy of undetermined significans*), у части которых со временем развивается клиника множественной миеломы, макроглобулинемии Вальденстрема, ХЛЛ и других В-клеточных опухолей [2].

Наконец, количество и качество опухолевого Ig предопределяет возможное развитие ряда клинических проявлений, осложняющих течение заболевания и объединяемых термином синдром белковой патологии.

В частности, с присутствием полимерных парапротеинов (чаще всего IgM) и высокомолекулярных агрегатов (IgG3), особенно при высоких концентрациях моноклональных Ig, связано повышение вязкости крови.

Если парапротеин обладает свойствами криоглобулина, т.е. обратимо преципитирует при температуре ниже 37°C, симптомы нарушения кровообращения резко выражены после охлаждения. При этом необходимо учитывать, что при повышении концентрации криоглобулина повышается и температура его преципитации, что усиливает вероятность развития клинической симптоматики.

Парапротеины и/или их фрагменты могут формировать тканевые включения разнообразного строения и локализации, что приводит к нарушению функции пораженных органов и развитию грозного осложнения моноклональной гаммапатии, которое в настоящее время предложено обозначать обобщающим термином «болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов» (*monoclonal immunoglobulin deposition disease*).

В зависимости от локализации патологических включений и их структурных особенностей выделяют несколько видов болезни отложения Ig. Как правило, патогенным действием обладает белок Бенс-Джонса, а органом-мишенью в первую очередь являются почки, принимающие участие в катаболизме микроглобулинов. Чаще всего аморфные белковые отложения (в виде гиалиновых цилиндров) образуются в просвете дистальной части почечных канальцев, что приводит к развитию восходящего нефросклероза

с исходом во вторично сморщенную почку и почечную недостаточность. Реже в клетках проксимального отдела почечных канальцев формируются кристаллические белковые включения, состоящие из переменных доменов моноклональных легких цепей, в подавляющем большинстве случаев к-типа, что приводит к развитию проксимальной тубулопатии, известной как приобретенный синдром Фанкони. Он характеризуется нарушением абсорбционной функции канальцевого эпителия в отношении микроглобулинов, аминокислот, глюкозы и электролитов. В части случаев происходит образование конгофильных фибриллярных структур, содержащих AP-белок (белок, характерный для амилоида) и отличающихся диссеминированным периколлагеновым типом распределения, и тогда речь идет об AL-амилоидозе. Если же диссеминированные включения имеют, в отличие от линейных амилоидных, глобулярный характер, аморфную структуру и не содержат AP-белок, то говорят о болезни отложения легких или тяжелых цепей (*light/heavy chain deposition diseases*). Оба типа отложений локализуются в области капсулы клубочка, а клинически поражение почек проявляется развитием нефротического синдрома и почечной недостаточности [2, 3].

Развитие вторичного синдрома Фанкони и болезни отложения легких цепей с образованием аморфных включений связано в основном с белками Бенс-Джонса к-типа, в то время как амилоид формируется преимущественно за счет моноклональных L – цепей λ -типа. Предполагают, что структура белковых отложений в определенной мере может быть связана с молекулярной формой белка BJ (димер или мономер), зарядом молекулы, углеводным составом парапротеина, который влияет на степень агрегации молекул и, возможно, на адгезивные свойства белка. Показано значение первичной структуры каркасных участков V_L – областей, в которых выявлены ключевые аминокислотные позиции, определяющие стабильность третичной структуры молекулы. Так, например, установлено, что замещение некоторых заряженных аминокислот незаряженными или неполярными аминокислотными остатками приводит к появлению белка, образующего амилоидные структуры или аморфные отложения, характерные для болезни отложения легких цепей.

К клиническим проявлениям синдрома белковой патологии могут приводить не только структурные особенности парапротеина, сказывающиеся на его физико-химических свой-

ствах, но и антительная активность моноклонального Ig, особенно к собственным антигенам организма.

Примером может служить холодовая гемагглютинация эритроцитов, вызванная моноклональным IgM (чаще к), обладающим специфической активностью к Ii антигену эритроцитарной мембраны. Эти парапротеины являются полными агглютинидами с функциональным оптимумом ниже 37°C.

Хорошо известна также ревматоидная активность парапротеинов, то есть их способность специфически связываться с Fc-фрагментом поликлонального IgG. Моноклональные ревматоидные факторы (РФ) найдены среди всех изотипов Ig, однако чаще всего они также относятся к IgM-классу. Присутствие моноклональных РФ, особенно в высоких титрах, сопровождается развитием клиники иммунокомплексного синдрома, особенно тяжело протекающего, если образующиеся иммунные комплексы обладают криосвойствами (криоглобулинемия II типа).

Среди IgM и IgG-парапротеинов описаны белки со свойствами антител к антигену миелиновых волокон нейронов – миелин-ассоциированному гликопротеину (МАГ) и некоторым другим компонентам нервной ткани. Антительная активность парапротеинов в этих случаях ведет к развитию демиелинизации нервных волокон, что сопровождается клиникой сенсорной (чаще) или сенсорно-моторной нейропатии [3].

Известны парапротеины, обладающие свойствами антител к плазменным факторам свертывания крови, что может сопровождаться развитием геморрагического синдрома. Под нашим наблюдением около 20 лет находится пациентка с приобретенной болезнью Виллебранда и устойчивым низким уровнем моноклональной секреции IgGκ.

Существенно, что выраженность проявлений синдрома белковой патологии в большинстве случаев не зависит от уровня моноклональной секреции, а также от массы опухолевого клона, и дебютом заболевания может быть одно из перечисленных осложнений. В этих случаях выявление моноклональной гаммапатии вносит существенный вклад в диагностику.

Принципы иммунохимической диагностики моноклональных гаммапатий основаны на сочетании нескольких методов исследования, позволяющих охарактеризовать качественные и количественные особенности патологических и нормальных Ig обследуемого пациента.

Прежде всего, проводится **электрофорез белков сыворотки и концентрированной**

мочи. Структурная идентичность молекул P_{II} определяет их одинаковый электрический заряд, поэтому при электрофорезе (ЭФ) они образуют гомогенную полосу – М-градиент – в отличие от структурно разнообразных поликлональных иммуноглобулинов, формирующих диффузное пятно в β-γ-зоне. Обнаружение М-градиента служит основой иммунохимической диагностики моноклональной гаммапатии (рис. 39).

Поскольку выявление М-градиента – ключевой момент в диагностике моноклональной секреции, для проведения ЭФ должен быть выбран вариант с высокой чувствительностью и хорошим разрешением. Этим требованиям отвечает ЭФ в геле агарозы или современный ва-

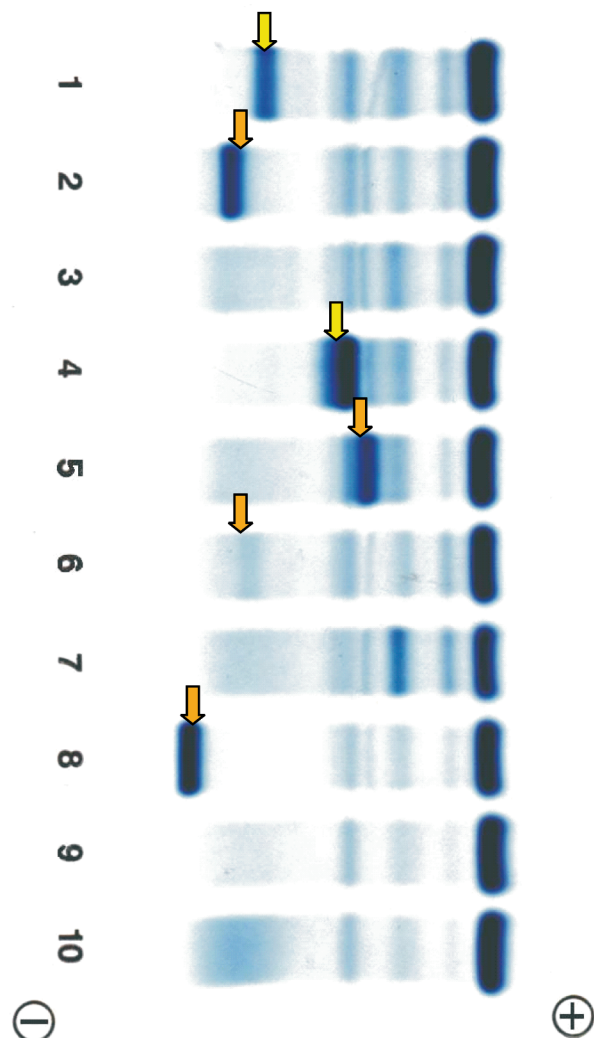


Рис. 39. Электрофорез сывороток в геле агарозы.

В образцах 1, 2, 4, 5, 6, 8 выявлены М-градиенты (указаны стрелками).

риант электрофореза в жидкой фазе – капиллярный ЭФ. Трудности в выявлении М-градиента могут быть связаны с низкой концентрацией парапротеина, а также маскирующим эффектом других белков сыворотки или мочи, особенно если ПП мигрирует в зоне α - или β -глобулинов. С другой стороны, в ряде случаев на ЭФ-грамме выявляются так называемые «ложные» М-градиенты, образование которых связано с патологически высоким содержанием белков неиммуноглобулиновой природы (фибриноген, С-реактивный белок, лизоцим в γ -зоне, α_2 -макроглобулин в α_2 -зоне, свободный гемоглобин, генетические варианты трансферрина в зоне β -глобулинов). Кроме того, большое количество крупных иммунных комплексов и наличие криоглобулинов также может привести к образованию нерастворимого осадка в области стартовой лунки и имитировать М-градиент [4].

При поиске моноклональной секреции обязательным является электрофоретическое исследование концентрированной мочи, несмотря на то, что общепринятыми биохимическими методами протеинурия может не выявляться. Биохимические реакции (особенно основанные на осаждении белка) недостаточно чувствительны, особенно при микроглобулинурии, а термопреципитация в кислой среде, которая считается качественной пробой на присутствие белка Бенс-Джонса, также малочувствительна и неспецифична, поэтому дает как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Электрофоретическое исследование концентрированной мочи является методом выбора для выявления парапротеинурии.

На ЭФ-грамме нормальной мочи, сконцентрированной в 50–100 раз, белковых полос не выявляется совсем, или видна следовая полоса альбумина. При патологической протеинурии появляются маркерные белки, спектр которых позволяет определить тип протеинурии (клубочковая, канальцевая, перегрузки) и степень ее селективности (рис. 40). Таким образом, моча, в отличие от сыворотки, является крайне нестандартной по белковому составу биологической жидкостью. Поэтому выявление М-градиента на ЭФ-грамме мочи зачастую представляет особые трудности.

Для преодоления трудностей идентификации фракций на ЭФ-грамме сыворотки и мочи во многих случаях для выявления следовых и скрытых М-градиентов используется **иммунофиксация (ИФ)**, которая позволяет иммунохимически идентифицировать индивидуальные белки на электрофореграмме без потери нагляд-

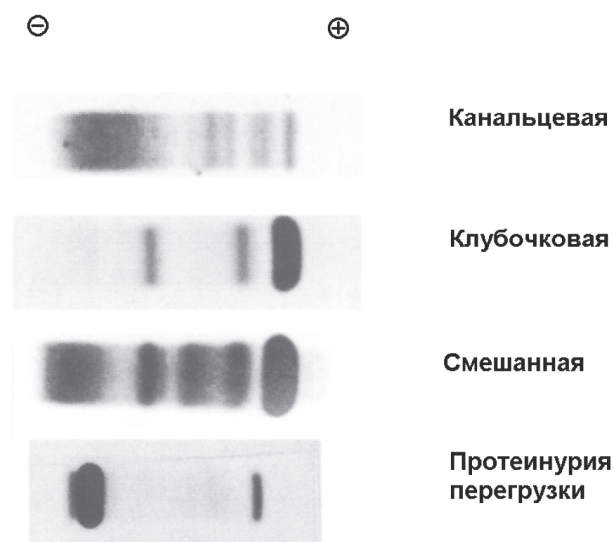


Рис. 40. Электрофореграммы образцов концентрированной мочи при различных типах протеинурий (по Levinson S.S., 2000).

ности и четкости классической электрофоретической картины (рис. 41). Суть метода заключается в том, что электрофореграммы проявляются не окрашиванием, а антисыворотками к разным антигенным детерминантам Ig. Сначала делают несколько треков разгона исследуемого образца, а после завершения форе-реза на поверхность каждого из треков нано-

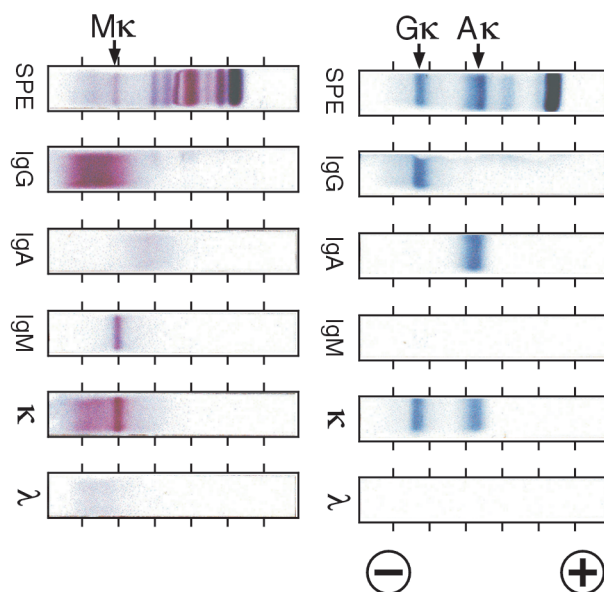


Рис. 41. Выявление моноклональных Ig методом иммунофиксации.

А – следовой MlgMκ в γ -зоне. В – двойная секреция Gκ (в γ -зоне) и Aκ (в β -зоне). Mlg указаны стрелками. Анод справа.

сятся антисыворотки к тяжелым и легким цепям Ig. Через 10–20 мин в месте расположения белка, прореагировавшего с соответствующей антисывороткой, образуется иммунный преципитат, который полностью сохраняет форму и положение изучаемой фракции. Таким образом, ИФ позволяет наглядно сопоставить электрофоретическую подвижность белковой полосы с ее иммунохимической характеристикой [3, 4].

Метод идеально подходит для идентификации следовых М-градиентов, выявления скрытых и анализа множественных градиентов, распознавания «ложных» М-компонентов.

Достоинством метода является его высокая чувствительность в выявлении М-градиентов, которая в несколько раз превосходит чувствительность ЭФ и более чем в 2,5 раза – ИЭФ. Это объясняется, помимо обсуждавшихся выше причин, накоплением белка (антител) в зоне градиента во время образования специфического преципитата, после чего он становится видимым. В соответствии с современными диагностическими стандартами состояние иммунохимической ремиссии при лечении миеломы и родственных ей заболеваний требует обязательного подтверждения методом иммунофиксации.

При исследовании мочи и других малобелковых жидкостей организма для усиления чувствительности можно применять противоточный изотохофорез по Абелеву с последующей иммунофиксацией. Это метод ЭФ в неоднородной системе буферов, позволяющий сочетать электрофоретическое разделение молекул с дополнительным концентрированием белковых фракций в градиенте pH.

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) также основан на иммунопроявлении ЭФ-грамм, но от ИФ его отличают условия формирования иммунного преципитата: в ИЭФ используется двойная диффузия разделенных в ЭФ белков образца и специфических антисывороток навстречу друг другу. В месте эквивалентного соотношения антигена и антител образуется преципитат, наличие, форма и локализация которого позволяют судить как о присутствии исследуемого белка в пробе, так и о его электрофоретических свойствах и иммунохимических особенностях.

В настоящее время область применения ИЭФ в диагностике иммуноглобулинопатий ограничена в связи широким внедрением более чувствительного, наглядного и быстрого метода ИФ. Однако в ряде случаев использование ИЭФ вполне оправдано. Так, он используется для скрининга образцов мочи при подозрении на присутствие в них следового количества белка

Бенс-Джонса, для определения типа белка Бенс-Джонса, для выявления и анализа белков болезнью тяжелых цепей.

Вторым обязательным исследованием при поиске и мониторинге моноклональной секреции является количественная оценка сывороточных IgG, IgA, IgM и определение соотношения IgG/IgA.

Методы количественного определения иммуноглобулинов разнообразны. Выбор метода обусловлен уровнем концентрации Ig в исследуемом материале, физико-химическими характеристиками образца и реагентов, наличием специального оборудования, количеством исследований, выполняемых одномоментно, срочностью получения результата. Наиболее широко для диагностических целей применяются методы, основанные на количественной регистрации специфического преципитата, образовавшегося в результате реакции антигена (исследуемого Ig) с антителами, присутствующими в иммунохимическом реагенте. Реакция преципитации может протекать как в жидкой фазе (при нефелометрическом и турбидиметрическом анализе), так и в агаровом геле (при использовании радиальной иммунодиффузии). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки [3, 4].

Метод радиальной иммунодиффузии (РИД) основан на образовании иммунного преципитата при диффузии белков образца в гель, содержащий преципитирующие антитела. При этом площадь образующегося преципитата пропорциональна количеству исследуемого белка. Метод не требует дорогостоящего оборудования, однако для срочных исследований не годится, так как для получения результата необходима суточная инкубация пластин.

Кроме того, одним из принципиальных требований метода является идентичность исследуемого белка, содержащегося в стандартном материале и опытном образце, в отношении молекулярной массы и антигенных особенностей. Именно поэтому метод РИД не рекомендуют использовать для определения уровня парапротеинов.

При **нефелометрии** и **турбидиметрии** реакция антиген-антитело протекает в жидкой фазе. Поэтому количественное определение иммунного преципитата можно проводить уже через несколько минут после внесения в образец антител, измеряя с помощью приборов мутность пробы.

Судить о мутности раствора можно двумя способами: по количеству рассеянного света и

по количеству прошедшего; первый способ называется нефелометрией, второй – турбидиметрией. Нефелометрия точнее и надежнее, так как фоновые значения прибора очень малы, и даже небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию сигнала, который в широких пределах пропорционален размеру осадка. При турбидиметрии количество преципитата должно быть таким, чтобы рассеялось не менее 10–20% света, иначе измерение будет недостоверным. Важно, что структурные особенности моноклональных Ig гораздо меньше сказываются на результатах измерения иммунной преципитации по мутности раствора, чем при использовании иммунодиффузии в геле.

Для проведения нефелометрии и турбидиметрии в клинической практике удобно использовать автоматизированные системы, адаптированные для проведения серийных диагностических исследований, отвечающих критериям контроля качества [3].

Таким образом, привлекательными сторонами рассматриваемых методов являются быстрота и точность измерения, большая пропускная способность автоматизированных систем, однако они нуждаются в специальном оборудовании и реагентах. Отличительная особенность **иммуноферментного анализа (ИФА)** – использование индикаторных антител (реже антигенов), соединенных с ферментативной меткой. Характерной чертой ИФА является сочетание специфичности, свойственной реакциям антиген-антитело, с высокой чувствительностью определения, позволяющей выявлять нанограммовые количества веществ.

В лабораторной диагностике моноклональных гаммапатий ИФА применяется для определения уровня Ig, синтезируемых в небольших количествах (IgE), а также имеющих незначительные антигенные различия (субклассы IgG и IgA, свободные и связанные легкие цепи), и кроме того, для анализа малобелковых биологических жидкостей (спинномозговая жидкость, слюна, секреты, неконцентрированная моча).

Определенную проблему составляет **измерение уровня парапротеина** в сыворотке и моче. В настоящее время оптимальным методом считается денситометрия фореграмм, поскольку прибор дает возможность выделить пик, соответствующий М-градиенту, и рассчитать содержание в нем белка (рис. 42). Нефелометрия также может быть использована для определения уровня парапротеина, особенно при низком уровне секреции, когда невозможно выделить пик парапротеина на денситог-

рамме, однако следует помнить, что этот метод определяет суммарное количество парапротеина и поликлональных иммуноглобулинов того же класса. При успешной терапии, когда количество парапротеина снижается, а уровень поликлональной секреции нарастает, данные нефелометрического определения относительно изменения уровня парапротеина будут менее достоверны, чем данные денситометрии ЭФ-грамм [3, 4].

Выполнение иммунохимической диагностики должно отвечать нескольким принципиальным требованиям. Иммунохимический анализ является многоэтапным поисковым исследованием, все этапы которого необходимо проводить и оценивать в одной лаборатории. Исследование должно заканчиваться формулированием иммунохимического заключения, основанного на комплексной оценке результатов всех примененных методов анализа. Нужно заметить, что направление и глубина диагностического иммунохимического поиска, а также трактовка полученных результатов в немалой степени определяются клинико-лабораторным комплексом, имеющимся у больного. Кроме того, не всегда диагностический поиск при анализе иммуноглобулинопатий приводит к однозначному заключению. Как и любой другой вид лабораторного и инструментального исследования, иммунохимическое исследование имеет свою «серую зону». Именно в таких случаях особенно необходима информация о клинической ситуации, в которой проводится анализ. В ряде случаев, особенно если речь идет о следовой или множественной секреции, необходимы повторные исследования для решения вопроса о характере гаммапатии.

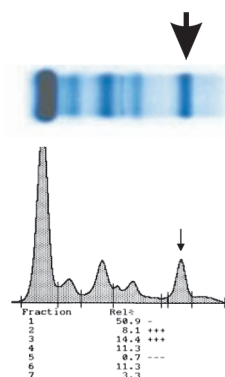


Рис. 42. Денситограмма белков сыворотки крови. В сыворотке выявлен М-градиент, которому соответствует пик α на денситограмме (указаны стрелками). Анод слева.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СЦИНТИГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЛЛИЯ-67 ЦИТРАТА

Применение радиоактивного галлия в клинической медицине используется при топической диагностике, оценке эффективности проведенного лечения, уточнении распространенности в первую очередь лимфатических опухолей, рака легких, туберкулеза легких, саркоидоза легких [1].

Метод основан на повышении накопления радионуклида в опухолевых клетках по сравнению с окружающими здоровыми тканями, что позволяет осуществить визуализацию опухоли с помощью сцинтиграфии (рис. 43, 44).

Регистрация препарата может осуществляться с использованием обычной планарной, двухголовочной гамма-камеры, а также с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии – ОФЭКТ (последняя является наиболее информативной и позволяет более точно определять топографическое расположение опухоли) [2].

Препарат цитрат галлия-67 имеет период полураспада 78,1 часа, энергия гамма-квантов составляет 92 Кэв (39.6%), 184 кэв (22.9%), 300 кэв (20.5%) и 394 кэв (8%). Цитрат галлия-67, выпускаемый заводом «Медрадиофармапрепарат» МЗ РФ, поставляется в стерильных флаконах, имеет вид прозрачного раствора с удельной активностью 3,8 мКи/мл pH-5,6. Доза вводимого внутривенного препарата составляет 3–40 мКи/кг веса пациента.

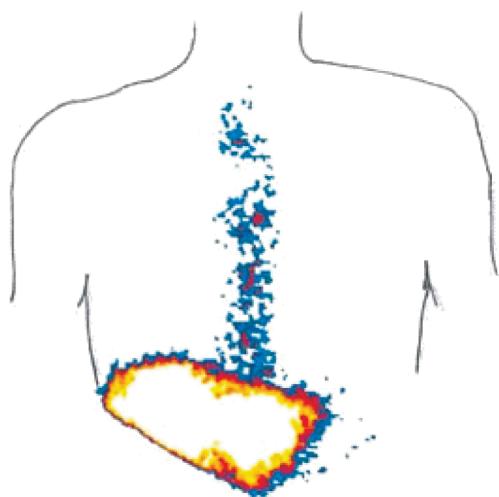


Рис. 43. Сцинтиграмма. Нормальное распределение цитрата галлия-67.

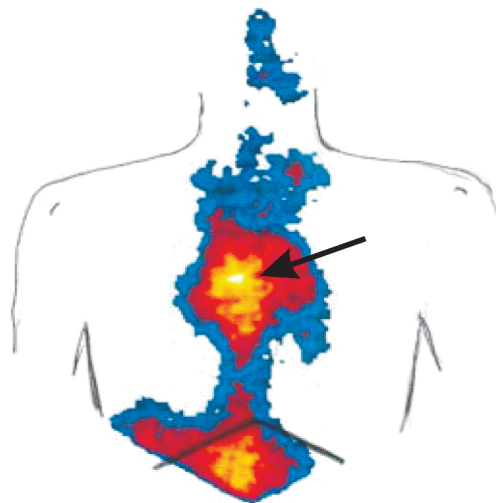


Рис. 44. Патологическое накопление цитрата галлия-67 в области опухоли средостения у больного лимфогранулематозом (указано стрелкой).

Цитрат галлия-67 является сравнительно прочным соединением. В крови он соединяется с трансферрином плазмы, проникает внутрь опухолевой клетки и фиксируется в лизосомах. Механизм преимущественного накопления данного радиофармпрепарата в бластоматозных клетках тканей до сих пор полностью не раскрыт. После в/в введения цитрат галлия-67 распределяется в печени, кишечнике, селезенке, костном мозге. Выделение осуществляется, главным образом, через кишечник. Биологический и эффективный периоды полураспада равны 25 и 3,1 дням соответственно.

Аппаратура. Исследование может проводиться на любой линейной гамма-камере в режиме планарной прицельной сцинтиграфии в передней, задней, если нужно в боковых проекциях. Сцинтиграфия с использованием полипозиционной двухголовочной гамма-камеры в двух проекциях, а также однофотонная эмиссионная компьютерная томография расширяет возможности метода.

При планарной сцинтиграфии органов грудной клетки с помощью галлия-67 цитрата специальной подготовки больных не требуется. Планарная сцинтиграфия органов брюшной полости, сцинтиграфия в режиме «все тело», а также ОФЭКТ всего тела требует тщательной предварительной очистки кишечника, в связи с экс-

рецией цитрата галлия-67 через желудочно-кишечный тракт. Полная очистка кишечника от накопившегося в нем препарата достигается после назначения слабительных, адсорбирующих средств накануне исследования и повторной очистительной клизмы до чистой воды непосредственно перед началом сканирования.

Диагностика новообразований с помощью цитрата галлия-67 заключается в выявлении очагов патологически повышенного накопления препарата в опухоли. При интерпретации сцинтиграмм необходимо иметь в виду области повышенного физиологического накопления препарата, которые хорошо визуализируются при сцинтиграфии всего тела у практически здоровых людей (см. рис. 43).

В убывающем порядке накопление препарата выявляется следующим образом: печень, селезенка, кости, почки, кишечник, носоглотка, средостение. Низкая концентрация РФП определяется в паренхиме легких и мышцах. При исследовании детей следует помнить о повышенной фиксации препарата в зонах эпифизарного роста костей и в тимусе.

Сцинтиграфия с цитратом галлия-67 позволяет проводить не только качественную (визуальную) оценку полученного изображения (см. рис. 43), но и количественную оценку, которая помогает дифференцировать физиологическое накопление от патологического. Количественная оценка имеет наибольшее значение в тех случаях, когда имеется остаточное образование средостения, расположенное по срединной линии. Имеет смысл проведение сцинтиграфии до лечения, не столько для определения топика и размеров опухоли, что само по себе очень важно, сколько для контроля за состоянием опухоли и ответом на проводимое лечение в дальнейшем (рис. 45, 46). В некоторых случаях лимфатическая опухоль изначально не накапливает радионуклид. Дальнейший сцинтиграфический мониторинг в этих случаях теряет как диагностическую, так и прогностическую ценность.

Кроме того, возможно уточнение степени распространенности опухолевого процесса, контроль за эффективностью проводимого противоопухолевого лечения, раннее выявление рецидивов и подтверждение рефрактерного к лечению лимфогранулематоза или лимфосаркомы, определение природы остаточного образования средостения на этапах цитостатической или лучевой терапии [3, 4].

Остаточное образование средостения – образование, превышающее 2 см в диаметре по данным КТ и остающиеся в средостении без

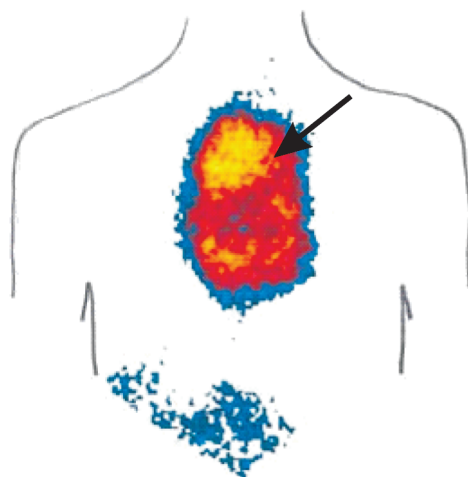


Рис. 45. Патологическое накопление цитрата галлия-67 в области опухоли средостения у больного лимфогранулематозом (указано стрелкой).

изменения размеров в течение 2 мес во время или после окончания лечения. Клинические признаки при этом отсутствуют. Прекращение или возобновление терапии возможно лишь после хирургического удаления и гистологического исследования остаточного образования средостения.

Лучшие результаты по разрешающей способности сцинтиграфия с галлием-67 дает при поражениях медиастинальных лимфатических узлов (около 90%) [5], в то время как при определении вовлеченных в процесс забрюшинных лимфоузлов результаты значительно скромнее – около 60%, что указывает на меньшую диаг-

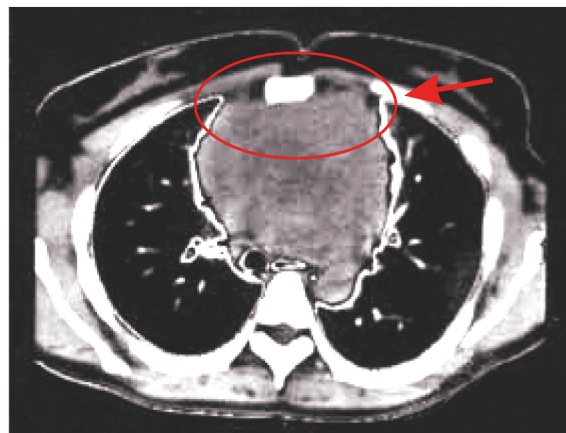


Рис. 46. Компьютерная томограмма органов грудной клетки больного (см. рис. 45). Опухолевый конгломерат в средостении.

ностическую ценность сцинтиграфии с галлием-67 при исследовании данной области.

При применении цитрата галлия-67 в дифференциальной диагностике увеличенных лимфатических узлов следует помнить, что при опухолевых заболеваниях, сопровождающихся гиперплазией лимфатических узлов, цитрат галлия-67, как правило, не накапливается. Однако при их остром воспалении имеет место повышенное накопление препарата [6, 7].

Распознавание поражений печени и селезенки представляет трудности, обусловленные физиологическим накоплением в них радионуклида? и возможно лишь при обширных опухо-

левых изменениях, сопровождающихся гепатоспленомегалией. В данном случае возможно обойтись применением УЗИ и КТ. Для выявления метастатического поражения костей при лимфогранулематозе и лимфосаркомах целесообразно применение сцинтиграфии костей с использованием Тс99м-пирфотеха.

Противопоказания. Ввиду высокой концентрации цитрата галлия-67 в материнском молоке противопоказанием к его применению является лактация при условии кормления грудью ребенка, а также беременность. Осложнений при применении индикаторных диагностических доз препарата не наблюдается.