

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Дмитрий Эдуардович Цыплаков¹, Антон Борисович Бажанов^{2*}

¹Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

²Городская клиническая больница №7, г. Казань, Россия

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-971

Цель. Количественный анализ и иммуногистохимическое фенотипирование структурных и клеточных элементов лимфатических узлов, регионарных к раку желудка, при отсутствии и наличии в них метастазов.

Методы. Изучены регионарные лимфатические узлы, полученные во время операций по поводу рака желудка от 48 больных (31 мужчины и 17 женщин, средний возраст которых составил 60,9 года). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, азур-II-эозином, пиронином по Браше. Затем проводили морфометрический анализ структурных и клеточных элементов лимфатического узла. Для иммуногистохимических реакций использовали набор моноклональных антител против CD45, CD3, CD4, CD8, CD10, CD20, CD30, BLA-36, λ- и κ-цепей иммуноглобулинов (Ig), CD56, миелопероксидазы, CD68, лизоцима, α₁-антитрипсина, CD35, S100, Ki-67, CD31, коллагена IV типа, виментина, десмина. Сравнительное исследование проводили в следующих группах: (1) контроль, (2) лимфатические узлы без метастазов, (3) лимфатические узлы с метастазами различного объема.

Результаты. При развитии рака желудка в регионарных лимфатических узлах обнаруживались паракортикальная и фолликулярная гиперплазия, синусный гистиоцитоз, а также микроциркуляторные расстройства и фибропластические процессы. Паракортикальная гиперплазия иммуногистохимически характеризовалась следующим фенотипом: CD45, CD3, CD4, CD8, CD10, CD30, CD56, S100, CD31, Ki-67. При гиперпластической фолликулярной реакции преимущественно экспрессировались CD45, CD20, BLA-36, CD10, CD30, CD35, λ- и κ-цепи Ig, Ki-67. Реакция синусов сопровождалась увеличением общей клеточности с преобладанием CD68(+), α₁-антитрипсин(+) и лизоцим(+) клеток. При появлении метастазов на фоне уменьшения площади паракортикальной зоны происходило снижение экспрессии CD3, CD4, CD8, CD10, CD56, Ki-67. Синусы были опустошены и бедны клеточными элементами, зачастую с явлениями лимфостазов или склероза. Иммуногистохимически в них определялась умеренная реакция с моноклональными антителами против α₁-антитрипсина, низкая — против лизоцима, миелопероксидазы, высокая — против виментина. При этом сохранялась фолликулярная гиперплазия с высоким содержанием CD20(+) В-клеток, BLA-36(+) активированных лимфоцитов и Ig(+) антителообразующих плазматических клеток может способствовать приживлению в лимфатических узлах метастазов и дальнейшей генерализации опухолевого процесса.

Вывод. В регионарных лимфатических узлах при развитии рака желудка меняются соотношение площадей структурных компонентов, клеточный состав и иммуногистохимический фенотип, при этом есть существенные различия между интактными и пораженными лимфатическими узлами; уменьшение площади паракортикальной зоны и синусов со снижением экспрессии Т-, NK-клеточных и макрофагальных маркеров на фоне сохранения фолликулярной гиперплазии с высоким содержанием активированных В-лимфоцитов и антителообразующих плазматических клеток может способствовать приживлению в лимфатических узлах метастазов и дальнейшей генерализации опухолевого процесса.

Ключевые слова: рак желудка, регионарные лимфатические узлы, морфометрия, иммуногистохимия.

MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF REGIONAL LYMPH NODES IN GASTRIC CANCER

D.E. Tsyplakov¹, A.B. Bazhanov²

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

²City Clinical Hospital №7, Kazan, Russia

Aim. To perform quantitative analysis and immunohistochemical phenotyping of regional lymph nodes structural and cellular elements in gastric cancer in the absence and the presence of metastases.

Methods. The regional lymph nodes obtained during surgery for gastric cancer from 48 patients (31 men and 17 women, mean age 60.9 years) were studied. Histological sections were stained with haematoxylin and eosin, van Gieson stain, azure-II-eosin, pyronin by Brashe. Then morphometric analysis of lymph nodes structural and cellular elements was performed. A set of monoclonal antibodies against CD45, CD3, CD4, CD8, CD10, CD20, CD30, BLA-36, immunoglobulin (Ig) λ- and κ-chains, CD56, myeloperoxidase, CD68, lysozyme, α₁-antichymotrypsin, CD35, S100, Ki-67, CD31, collagen type IV, vimentin, desmin was used for immunohistochemical reactions. Comparative study was performed in the following groups: (1) control group; (2) lymph nodes without metastases; (3) lymph nodes with metastases of different size.

Results. Paracortical and follicular hyperplasia, sinus histiocytosis, microcirculatory disorders and fibroplastic processes were found in regional lymph nodes in gastric cancer development. Paracortical hyperplasia was characterized by following immunohistochemical phenotype: CD 45, CD 3, CD 4, CD 8, CD 10, CD 30, CD 56, S 100, CD 31, Ki-67. CD45, CD20, BLA-36, CD10, CD30, CD35, Ig λ- and κ-chains, Ki-67 were mainly expressed in follicular hyperplastic reaction. The sinus reaction was accompanied by total cellularity increase with a predominance of CD68(+), α₁-antichymotrypsin(+) and lysozyme(+) cells. Expression of CD3, CD4, CD8, CD10, CD56, Ki-67 decreased amid the paracortical zone area reduce in metastases development. Sinuses were devastated and poor with cellular elements, often with lymphostasis or sclerosis signs. Immunohistochemically there was moderate reaction with monoclonal antibodies against α₁-antichymotrypsin, low —

against lysozyme, myeloperoxidase, and high — against vimentin. Wherein follicular hyperplasia with high levels of CD20(+) B-cells, BLA-36(+) activated lymphocytes and Ig(+) antibody producing plasma cells persisted. At the same time microcirculatory disorders and fibroplastic processes progressed.

Conclusion. Structural components area ratio, cellular composition and immunohistochemical phenotype change in the regional lymph nodes in gastric cancer development, with significant differences between intact and affected lymph nodes; paracortical zone and sinuses area reduction with T-, NK-cells and macrophage markers expression decrease amid the preservation of follicular hyperplasia with high level of activated B lymphocytes and antibody producing plasma cells can promote metastases engraftment in lymph nodes and further cancer generalization.

Keywords: gastric cancer, regional lymph nodes, morphometry, immunohistochemistry.

Рак желудка, согласно последним статистическим данным [3], продолжает занимать одно из первых мест по заболеваемости и смертности. При этом прогноз во многом зависит от адекватности лимфаденэктомии, поскольку проблема лимфогенного метастазирования является ключевой в достижении оптимальных результатов хирургического лечения [2].

В то же время изучение метастатического процесса при раке желудка приводит к достаточно противоречивым выводам. Так, одни авторы [12] утверждают, что существуют выраженные различия между поражён-

ными и интактными лимфатическими узлами, тогда как другие [13] доказывают, что определённых изменений в структуру лимфатического узла метастаз не вносит. Подобные противоречия обусловлены, прежде всего, отсутствием комплексного методического подхода. Мы считаем, что для объективной оценки состояния лимфатических узлов необходимо их морфометрическое исследование с параллельным использованием широкой панели моноклональных антител (МКАТ).

Целью настоящей работы явились количественный анализ и иммуногистохимичес-

Таблица 1

Характеристика первых антител

Антиген	Клон	Специфичность	Рабочее разведение	Фирма-производитель
CD45	MS355-R	Все лейкоциты	1:200	Thermo
CD3	SP7	Т-лимфоциты	1:15	Lab Vision
CD4	MS1528-S	Т-хелперы/индукторы	1:50	Thermo
CD8	MS457-s	Т-киллеры/супрессоры	1:50	Thermo
CD20	L26	В-лимфоциты	1:250	Lab Vision
CD10	56C6	Иммунобласты	1:50	Dako
CD30	BER-H2	Активированные лимфоциты	1:50	Cell Marque
BLA-36	A27-42	Активированные В-лимфоциты	1:50	BioGenex
λ- и κ-цепи иммуноглобулинов (Ig)	Поликлональные, код HP6054 LIC1	Антителообразующие плазматические клетки	1:600	Dako
CD56	56C04	NK-клетки	1:100	Thermo
Миелопероксидаза	Поликлональные, код RB-373-A	Гранулоциты	1:800	Dako
CD68	PGM1	Все макрофаги	1:200	BioGenex
Лизоцим	Поликлональные, код PU 024-UP	Свободные макрофаги моноцитарного происхождения	1:100	Diagnostic Biosystems
α ₁ -Антихимотрипсин	A022	Фиксированные макрофаги — гистиоциты синусов	1:200	Dako
CD35	E11	Дендритные ретикулярные клетки	1:50	Diagnostic Biosystems
S100	E2144	Интердигитирующие ретикулярные клетки	1:300	Spring
Ki-67	B56	Пролиферирующие клетки	1:50	Pharmingen
CD31	9611	Эндотелий сосудов	1:20	BioGenex
Коллаген IV типа	PHM-12 + CIV22	Базальные мембраны	1:150	Lab Vision
Виментин	V9	Фибробласты, соединительная ткань	1:300	Lab Vision
Десмин	D33	Гладкомышечные клетки	1:400	BioGenex

Таблица 2

Площади структурных компонентов лимфатических узлов в норме и при метастазировании рака (%; $M \pm m$)

Группа	Капсула	Трабекулы	Кортикальная зона	Паракортикальная зона	Мякотные тяжи	Фолликулы	Фолликулы с реактивными центрами	Синусы
1	4,10±0,84	1,91±0,15	33,94±1,21	6,30±0,40	24,93±1,70	12,13±0,77	2,34±0,22	14,34±0,74
2	4,52±0,22	2,20±0,17	17,95±0,88*	14,73±0,97*	18,02±1,09*	5,08±0,78*	13,25±1,39*	23,89±1,30*
3	7,18±0,44**	3,58±0,26 **	22,85±1,64**	8,80±0,75**	22,37±1,46*	8,36±0,96**	12,40±1,28*	14,38±1,29*

Примечание: 1 — контроль (n=30); 2 — лимфатические узлы без метастазов (n=25); 3 — лимфатические узлы с метастазами (n=25); *p < 0,05 по сравнению с контролем; **p < 0,05 по сравнению с группой лимфатических узлов, свободных от метастазов.

кое фенотипирование структурных и клеточных элементов лимфатических узлов, регионарных к раку желудка, при отсутствии и наличии в них метастазов.

Были изучены регионарные лимфатические узлы (144), полученные во время операций по поводу рака желудка от 48 онкологических больных (31 мужчины и 17 женщин, средний возраст которых составил 60,9 года) в соответствии с наличием четырёх основных коллекторов лимфооттока. В качестве контроля послужили лимфатические узлы (30), полученные от 10 практически здоровых лиц тех же возрастных групп, погибших от случайных причин (судебно-медицинские вскрытия).

Лимфатический узел вдоль большой оси разрезали на две части. Одну часть фиксировали в 10% нейтральном формалине по Лилли или жидкости Карнуа и после соответствующей проводки заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, азур-П-эозином, пиронином по Брассе.

Вторая часть была использована для иммуногистохимического исследования [5] в соответствии с алгоритмом, разработанным для фенотипирования структурных и клеточных элементов лимфатического узла [1] (табл. 1). Применяли стандартный биотин-стрептавидин-пероксидазный метод (DAKO: LSAB[®] + System-HRP, код K0690) с диаминобензидином в качестве хромогена. Препараты дополнительно окрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский балзам или специальные среды фирмы DAKO (Ultramount, Faramount, код S302580-2). Характер иммуногистохимических реакций оценивали с учётом интенсивности и процента окрашенных клеток [5].

На гистологических препаратах проводили измерение площадей структурных компонентов лимфатического узла при помощи морфометрической сетки случайного

шага С.Б. Стефанова, а также количественное изучение клеточного состава с использованием морфометрической окулярной сетки Г.Г. Автандилова.

Полученные данные были обработаны статистически с вычислением критерия Стьюдента и величины p. Сравнительное исследование проводили в следующих группах:

- 1) контроль;
- 2) лимфатические узлы без метастазов;
- 3) лимфатические узлы с метастазами различного объёма.

В результате исследования установлено, что в лимфатических узлах, регионарных к раку желудка, имеются выраженные изменения, которые касаются практически всех структурных и клеточных элементов. При этом иммуноморфологические реакции стереотипны и не зависят от пола, возраста больных, гистологического типа первичной опухоли, принадлежности к определённому коллектору лимфооттока, а определяются исключительно отсутствием или наличием метастазов.

Так, ещё до появления клеток опухоли в лимфатических узлах по сравнению с контролем отмечалась тенденция к утолщению капсулы и увеличению числа трабекул (табл. 2). Иммуногистохимически в капсульно-трабекулярной основе и внеклеточном матриксе увеличивалась экспрессия виментина, десмина, коллагена IV типа и CD31.

В кортикальной зоне отмечалась выраженная плазматизация (рис. 1): количество зрелых и незрелых плазмочитов увеличивалось соответственно до 13,428±1,265 и 2,696±0,249% (табл. 3). Иммуногистохимически здесь возрастало число CD20(+) В-клеток, CD10(+) иммунобластов, BLA-36(+) активированных В-лимфоцитов и, как следствие, анти-Ig(+) антителообразующих плазматических клеток.

Таблица 3

Клеточный состав структурных компонентов лимфатических узлов в норме и при метастазировании рака (% , M±m)

	Группа	Кортикаль- ная зона	Паракор- тикальная зона	Мякотные тяжи	Первичные фолликулы	Фолликулы с реак- тивными центрами	Синусы
Регулярные клетки	1	15,820±0,704	6,947±0,358	20,590±2,352	10,340±0,722	19,206±0,912	35,820±1,074
	2	15,372±0,836	15,184±0,734*	19,252±1,053	17,680±1,198*	25,292±0,973*	43,228±1,350*
	3	15,640±0,815	13,924±0,953*	20,736±0,988	13,876±1,078*°	24,796±0,996*	45,472±1,541*
Иммунобла- сты	1	0,797±0,038	0,683±0,163	0,087±0,014	1,593±0,213	4,283±0,139	0,393±0,088
	2	0,792±0,199	1,312±0,308*	1,952±0,356*	1,836±0,238	7,420±0,650*	3,080±0,517*
	3	0,796±0,153	0,688±0,160	0,432±0,088*°	0,348±0,081*°	4,596±0,435°	0,758±0,183°
Большие лимфоциты	1	0,687±0,162	0,683±0,162	0,633±0,073	0,353±0,062	3,133±0,106	0,547±0,087
	2	0,664±0,109	0,724±0,115	0,616±0,105	1,052±0,148*	1,508±0,155*	0,156±0,045*
	3	0,544±0,115	0,552±0,114	0,488±0,107	0,552±0,129°	1,308±0,176*°	0,180±0,065*
Средние лимфоциты	1	33,070±1,555	26,577±0,940	30,720±1,551	27,437±0,776	26,340±1,555	21,637±2,057
	2	20,056±1,268*	22,196±1,594*	21,056±1,795*	22,300±1,538*	16,892±1,255*	15,116±0,992*
	3	26,784±1,510*°	23,944±1,661	23,860±1,625*	24,876±2,122	21,192±1,272*°	18,216±1,277
Малые лимфоциты	1	46,827±0,671	63,680±0,898	44,200±2,033	58,357±1,574	45,520±0,849	36,957±1,418
	2	45,512±1,342	55,240±1,688*	37,716±1,569*	53,064±2,000*	44,108±1,228	30,908±1,037*
	3	46,576±1,848	58,780±1,666*	45,092±1,979*°	59,148±2,083°	44,944±1,849	31,664±1,513*
Зрелые плазмocyты	1	1,767±0,211	0,773±0,184	2,780±0,374	0,717±0,185	0,410±0,096	2,043±0,369
	2	13,428±1,265*	2,592±0,591*	15,488±1,508*	1,648±0,355*	1,668±0,431*	3,832±0,561*
	3	7,408±1,079*°	1,192±0,244°	7,784±1,232*°	0,464±0,134°	0,720±0,146°	2,308±0,384°
Незрелые плазмocyты	1	0,503±0,100	0,207±0,075	0,740±0,113	0,240±0,065	0,113±0,026	0,657±0,104
	2	2,696±0,249*	0,476±0,163	2,860±0,263*	0,212±0,070	0,344±0,152	0,824±0,163
	3	1,472±0,222*°	0,228±0,069	1,272±0,263°	0,052±0,018*°	0,224±0,064	0,592±0,141
Тучные клетки	1	0,037±0,010	0,017±0,014	0,040±0,010	0,003±0,003	—	0,107±0,027
	2	0,096±0,068	0,088±0,030*	0,084±0,034	0,024±0,012	0,016±0,009	0,672±0,252*
	3	0,020±0,010	0,008±0,006°	0,008±0,008*°	—	—	0,064±0,020°
Эозинофилы	1	0,043±0,013	0,010±0,006	0,070±0,020	0,013±0,006	0,010±0,007	0,110±0,021
	2	0,080±0,048	0,004±0,004	0,004±0,004*	0,024±0,009	0,032±0,014	0,304±0,096*
	3	0,024±0,010	0,004±0,004	0,004±0,004*	0,004±0,004°	0,008±0,006	0,148±0,040
Нейтрофилы	1	0,023±0,011	0,013±0,008	0,043±0,010	0,013±0,006	0,007±0,005	0,043±0,011
	2	0,036±0,016	0,016±0,007	0,048±0,020	0,012±0,012	0,012±0,007	0,396±0,180
	3	0,044±0,021	0,004±0,004	0,012±0,009*	0,024±0,009	0,016±0,007	0,084±0,020
Макрофаги	1	0,247±0,064	0,310±0,074	0,043±0,014	0,083±0,024	0,617±0,149	1,663±0,256
	2	0,480±0,149	1,796±0,284*	0,880±0,220*	0,560±0,120*	1,928±0,269*	1,596±0,338
	3	0,552±0,136*	0,596±0,133°	0,176±0,077°	0,252±0,079*°	1,376±0,274*	0,492±0,150*°
Митозы	1	0,180±0,041	0,037±0,011	0,053±0,018	0,503±0,072	0,327±0,055	0,020±0,007
	2	0,064±0,019*	0,188±0,059*	0,080±0,040	0,604±0,149	1,060±0,166*	0,068±0,040
	3	0,140±0,056	0,080±0,022	0,096±0,050	0,404±0,137	0,976±0,150*	0,044±0,016

Примечание: 1 — контроль (n=30); 2 — лимфатические узлы без метастазов (n=25); 3 — лимфатические узлы с метастазами (n=25); *p <0,05 по сравнению с контролем; °p <0,05 по сравнению с группой лимфатических узлов, свободных от метастазов.

Лимфоидные фолликулы были гиперплазированы, содержали крупные реактивные центры (рис. 2) — их площадь увеличилась и достигала 13,25±1,39%. Возрастало по сравнению с контролем содержание иммунобластов, а также зрелых и незрелых плазмocyтов.

Иммуногистохимически здесь выявлялись CD20(+) В-лимфоциты, расположенные по всей площади фолликула, включая реактивный центр и мантийную зону (рис. 3), CD10(+) иммунобласты, Ki-67(+) пролиферирующие клетки (преимущественно герминативный центр), BLA-36(+) активированные

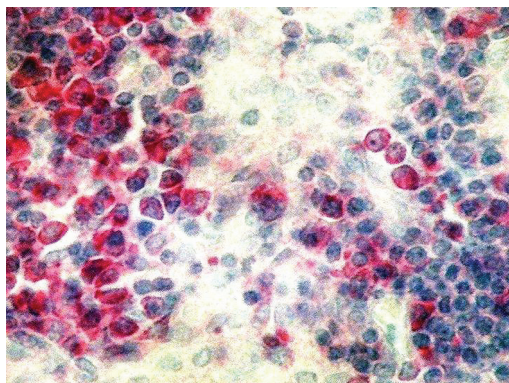


Рис. 1. Плазматизация мягкотных тяжей. Окраска пиронином по Брассе. $\times 600$

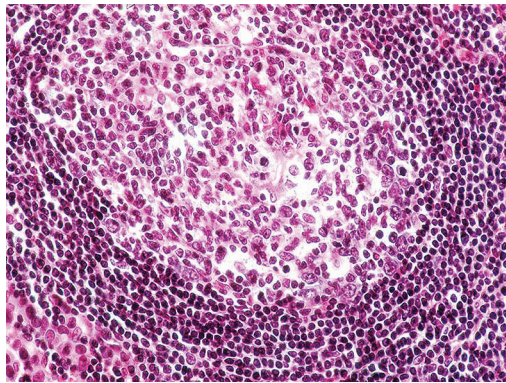


Рис. 2. Гиперплазированный лимфоидный фолликул с крупным реактивным центром. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

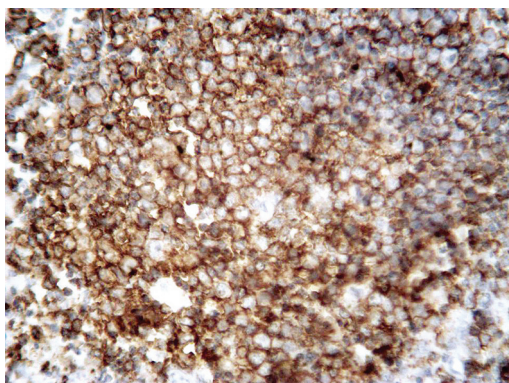


Рис. 3. CD20(+) В-лимфоциты в лимфоидном фолликуле. LSAB-метод с докраской гематоксилином. $\times 400$

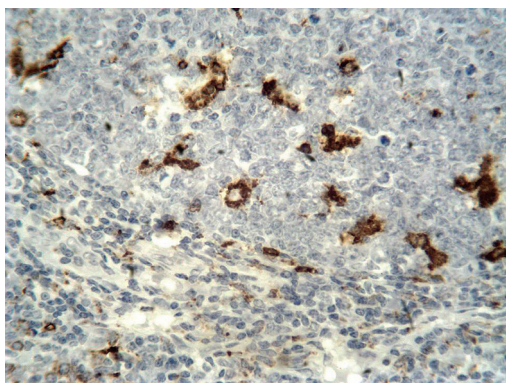


Рис. 4. CD68(+) макрофаги в реактивном центре фолликула. LSAB-метод с докраской гематоксилином. $\times 400$

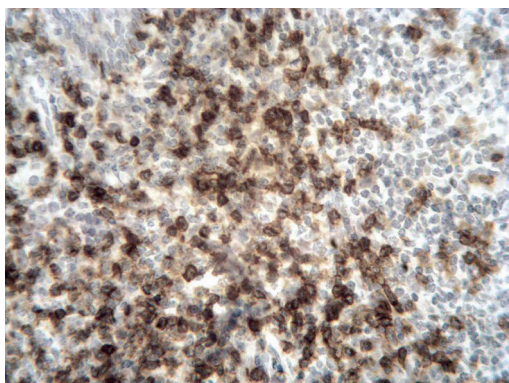


Рис. 5. CD3(+) Т-клетки в гиперплазированной паракортикальной зоне. LSAB-метод с докраской гематоксилином. $\times 400$

В-клетки и анти-Ig(+) плазматические клетки (мантийная зона и интерфолликулярный регион).

Обращало на себя внимание увеличение количества макрофагов в реактивных центрах — до $1,928 \pm 0,269\%$, с выраженной реакцией МКАТ против CD68 (рис. 4). Все клеточные элементы фолликулов были рас-

положены в сети CD35(+) дендритных ретикулярных клеток.

Определённые изменения, которые в целом были сходны с таковыми в кортикальной зоне, наблюдались и в мягкотных тяжях. Их площадь несколько уменьшалась за счёт гиперплазии паракортикальной зоны и синусов — до $18,02 \pm 1,09\%$. Здесь отмечалась выраженная плазматизация с увеличением процента как зрелых, так и незрелых плазматических клеток. Содержание данных клеточных форм составляло соответственно $15,488 \pm 1,508$ и $2,860 \pm 0,263\%$. Кроме того, в мягкотных тяжях увеличивалось содержание иммунобластов и макрофагов до $1,952 \pm 0,356$ и $0,880 \pm 0,220\%$ соответственно.

Выраженные изменения по сравнению с контрольной группой выявлялись в паракортикальной зоне. Она была резко гиперплазирована — $14,73 \pm 0,97\%$ общей площади среза лимфатического узла. Наблюдалось увеличение числа CD3(+) Т-клеток (рис. 5), за счёт как CD4(+) хелперов/индукторов, так и CD8(+) киллеров/супрессоров.

Возрастало содержание CD10(+) иммуно-

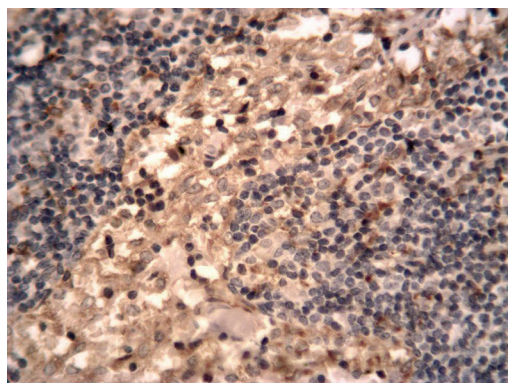


Рис. 6. Экспрессия α_1 -антихимотрипсина в ретикулярных клетках синуса. LSAB-метод с докраской гематоксилином. $\times 400$

бластов, CD30(+) активированных лимфоцитов и CD56(+) NK-клеток. Наличие пролиферативной активности подтверждалось высокой экспрессией Ki-67, а количество митотически делящихся клеток составляло $0,188 \pm 0,059\%$. Имела место тенденция к увеличению количества макрофагов (до $1,796 \pm 0,284\%$), позитивных на CD68 и лизоцим. Кроме того, в паракортикальной зоне обнаруживались ретикулярные клетки ($15,184 \pm 0,734\%$), большая часть которых, судя по экспрессии S100, относилась к интердигирующим ретикулоцитам.

Активно реагировали на опухолевый рост синусы лимфатических узлов — их площадь возрастала до $23,89 \pm 1,30\%$. Они в основном были заполнены плотно прилежащими друг к другу ретикулярными клетками, содержание которых достигало $43,228 \pm 1,350\%$. При этом иммуногистохимически больше всего выявлялись α_1 -антихимотрипсин(+), CD68(+) и лизоцим(+) (рис. 6). По сравнению с контролем в синусах возрастала и экспрессия МКАТ против CD3, CD4, CD8, CD10, CD30, CD56, миелопероксидазы, а в ряде случаев — против Ki-67, десмина, виментина и коллагена IV типа. Кроме того, здесь содержались плазматические клетки ($3,832 \pm 0,561\%$) с высокой антителообразующей способностью, что выявлялось окрашиванием МКАТ против λ - и к-цепей Ig.

Определённым изменениям подвергалось кровеносное микроциркуляторное русло лимфатических узлов. Сосуды были расширены и полнокровны. При использовании МКАТ против коллагена IV типа выявлялись разрыхление и фрагментация базальных мембран. Эндотелий выбухал в просвет сосудов, что видно по иммуногистохимической реакции против CD31.

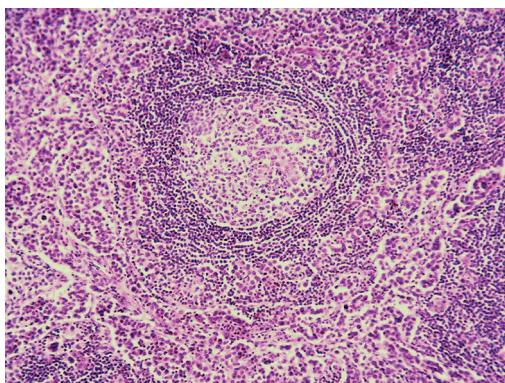


Рис. 7. Гиперплазированный фолликул, окружённый метастазами рака. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

При появлении метастазов в лимфатических узлах увеличивалась площадь капсулы (до $7,18 \pm 0,44\%$) и трабекул (до $3,58 \pm 0,26\%$) с высокой экспрессией в них десмина, виментина, коллагена IV типа и CD31.

Реакция кортикальной зоны и мягкотных тяжей на появление клеток опухоли при сохранении иммуногистохимического фенотипа проявлялась уменьшением числа плазмочитов. Однако это снижение было относительным, поскольку по сравнению с контролем их количество оставалось повышенным и составляло $7,408 \pm 1,079\%$ (корковое плато) и $7,784 \pm 1,232\%$ (мягкотные тяжи).

При использовании МКАТ против λ - и к-цепей Ig выявлялась высокая антителообразующая способность этих клеток. Расположенные в кортикальной зоне лимфоидные фолликулы при появлении метастазов не подвергались сколько-нибудь заметным изменениям. Они вплоть до полного замещения лимфатического узла опухолевой тканью оставались гиперплазированными, с наличием больших реактивных центров (рис. 7).

Площадь таких фолликулов составляла $12,40 \pm 1,28\%$. Клеточный состав также практически не менялся. Преобладала фолликулярная реакция со следующим иммуногистохимическим фенотипом: CD20, CD10, Ki-67, BLA-36, λ - и к-цепи Ig, CD35 (рис. 8), при невысокой экспрессии Т-клеточных и макрофагальных маркёров, особенно CD8.

В отличие от коркового плато и лимфоидных фолликулов, существенно реагировала на появление метастазов паракортикальная зона. Её площадь уменьшалась до $8,80 \pm 0,75\%$. Снижалась экспрессия CD3(+), CD4(+), CD8(+) маркёров. Существенно меньше выявлялось CD30(+) активированных лимфоцитов, CD10(+) иммунобластов

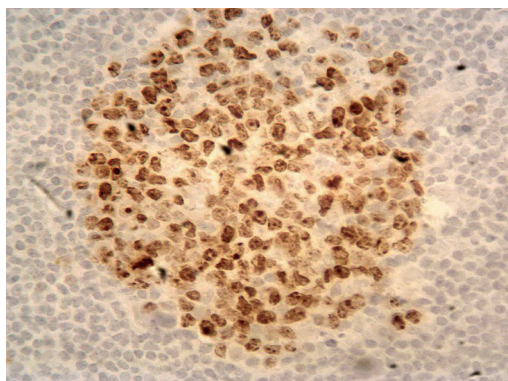


Рис. 8. Высокая пролиферативная активность клеток реактивного центра фолликула. Реакция с моноклональными антителами против Ki-67. LSAB-метод без докраски гематоксилином. $\times 400$

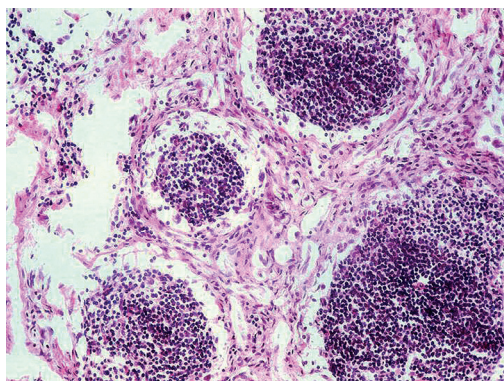


Рис. 9. Склероз синусов. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

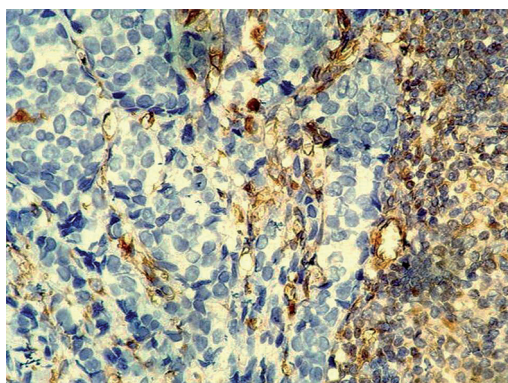


Рис. 10. Экспрессия виментина в синусе вокруг метастаза рака. LSAB-метод с докраской гематоксилином. $\times 40$

и Ki-67(+) пролиферирующих клеток. Редкой находкой были свободные макрофаги, содержащие лизоцим. Экспрессия S100, CD20, BLA-36, λ - и κ -цепей Ig в паракортикальной зоне при метастазировании не менялась.

Определённым изменениям при появлении метастазов в лимфатических узлах подвергались синусы. Прежде всего, обращало на себя внимание уменьшение их площади — до $14,38 \pm 1,29\%$. Они зачастую были опустошены и бедны клеточными элементами, что иногда сопровождалось лимфостазом. Кроме того, в синусах отмечалось разрастание соединительной ткани с повышением экспрессии виментина (рис. 9, 10). Изменялся и клеточный состав за счёт уменьшения количества иммунобластов, макрофагов и нейтрофилов — до $0,758 \pm 0,183$, $0,492 \pm 0,150$ и $0,084 \pm 0,020\%$ соответственно. При иммуногистохимическом анализе выявлялось снижение экспрессии CD68, лизоцима, миелопероксидазы и, в меньшей степени, α_1 -антихимотрипсина.

Редко встречались CD3(+), CD4(+), CD8(+), CD10(+), CD30(+) и CD56(+) элементы.

Продолжало изменяться параллельно росту опухоли и кровеносное микроциркуляторное русло лимфатических узлов. Кроме выраженного полнокровия, отмечался выход эритроцитов за пределы сосудистого русла. Реакция с МКАТ против CD31 выявляла выбухание эндотелия в просвет сосудов и его десквамацию, а с МКАТ против коллагена IV — деструкцию базальных мембран.

Таким образом, при развитии рака желудка в регионарных лимфатических узлах заметно меняются соотношение площадей структурных компонентов, клеточный состав и иммуногистохимический фенотип. До появления метастазов имеют место паракортикальная и фолликулярная гиперплазия, синусный гистиоцитоз. Оценивая эти изменения непоражённых лимфатических узлов, следует отметить, что Т-клеточная и макрофагальная реакции способны предотвращать процесс лимфогенного метастазирования или задерживать его [6]. Напротив, высокая активность В-лимфоцитов с плазматизацией может ему способствовать за счёт блокирующего действия гуморальных антител на цитотоксичность клеток-эффекторов [10].

При появлении метастазов на фоне уменьшения площади паракортикальной зоны происходит снижение экспрессии CD3, CD4, CD8, CD10, CD56, Ki-67. В то же время известно, что CD8(+) лимфоциты-киллеры являются основными цитотоксическими противоопухолевыми элементами [9], а CD4(+) хелперная субпопуляция необходима для их трансформации [8]. Это, однако, не сказывается на активации В-клеток, по-

скольку в ответ на ряд антигенов они могут пролиферировать и дифференцироваться без помощи Т-хелперов. CD56(+) НК-клетки также обладают опухолелитическими свойствами [14], и уменьшение их количества наряду с CD68(+) и лизоцим(+) макрофагами приводит к падению противоопухолевой цитотоксичности.

Изменения в синусах свидетельствуют о снижении функциональной активности фиксированных и свободных макрофагов, а также эозинофилов и нейтрофилов, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом [1]. В то же время сохраняется фолликулярная гиперплазия с высоким содержанием В-клеток, в том числе активированных, и антителообразующих плазмочитов.

Следует отметить и высокую функциональную активность CD35(+) дендритных ретикулярных клеток, реализующих переработку антигена для В-лимфоцитов [11], и недостаток CD8(+) Т-супрессоров, способных угнетать синтез иммуноглобулинов разных классов [4]. Прогрессирующие микроциркуляторные расстройства и стромально-сосудистые реакции также во многом определяют приживление в лимфатических узлах опухолевых клеток [7].

ВЫВОДЫ

1. В регионарных лимфатических узлах при развитии рака желудка меняются соотношение площадей структурных компонентов, клеточный состав и иммуногистохимический фенотип, при этом есть существенные различия между интактными и поражёнными лимфатическими узлами.

2. Иммуноморфологические реакции лимфатических узлов стереотипны и не зависят от пола, возраста больных, гистологического типа первичной опухоли, принадлежности к определённому коллектору лимфооттока, а определяются исключительно отсутствием или наличием в них метастазов.

3. Уменьшение площади паракортикальной зоны и синусов со снижением экспрессии Т-, НК-клеточных и макрофагальных маркёров при сохранении фолликулярной гиперплазии с высоким содержанием активированных В-лимфоцитов и антителообразующих плазматических клеток может способствовать приживлению в лимфатических узлах метастазов и дальнейшей генерализации опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белянин В.Л., Цыплаков Д.Э. *Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов*. СПб., Казань. 1999; 328 с. [Belyanin V.L., Tsyplakov D.E. *Diagnostika reaktivnykh giperplaziy limfaticheskikh uzlov*. (Diagnosis of lymph nodes reactive hyperplasia.) St. Petersburg, Kazan. 1999; 328 p. (In Russ.)]
2. Гуляев А.В., Симбирцев С.А., Лойт А.А. и др. Особенности лимфатического оттока от желудка и характеристика групп регионарных лимфатических узлов. *Вестн. хир. им. И.И. Грекова*. 2004; (6): 21–25. [Gulyaev A.V., Simbirtsev S.A., Loyt A.A. et al. Features of the stomach lymphatic drainage and regional lymph nodes groups characteristics. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*. 2004; (6): 21–25. (In Russ.)]
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. *Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г.* Издательская группа РОНЦ. 2014; 226 с. [Davydov M.I., Aksel' E.M. *Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2012 g.* (Malignant tumors statistics in Russia and the CIS countries in 2012.) Izdatel'skaya gruppa RONTs. 2014; 226 p. (In Russ.)]
4. Йегер Л. *Клиническая иммунология и аллергология*. В 3 томах. М.: Медицина. 1990; 1: 528 с. [Yeger L. *Klinicheskaya immunologiya i allergologiya*. V 3 tomakh. (Clinical immunology and allergy. In 3 volumes.) Moscow: Meditsina. 1990; 1: 528 p. (In Russ.)]
5. Петров С.В., Райхлин Н.Т. *Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека*. Казань. 2012; 624 с. [Petrov S.V., Raykhlin N.T. *Rukovodstvo po immunogistokhimicheskoy diagnostike opukholey cheloveka*. (Guidelines for immunohistochemical diagnosis of human tumors.) Kazan. 2012; 624 p. (In Russ.)]
6. Тупицын Н.Н. Субпопуляции иммуноцитов в гистологических срезах рака молочной железы. *Вопр. онкол.* 1994; (7–12): 314–318. [Tupitsyn N.N. Immunocytes subpopulations in histological sections of breast cancer. *Voprosy onkologii*. 1994; (7–12): 314–318. (In Russ.)]
7. Цыплаков Д.Э., Зиганшина Л.Е. Роль микроциркуляторных факторов в метастазировании рака. *Вопр. онкол.* 1988; (8): 932. [Tsyplakov D.E., Ziganshina L.E. The role of microcirculatory factors in cancer metastasis. *Voprosy onkologii*. 1988; (8): 932. (In Russ.)]
8. Gerloni M., Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005; 27: 37–48.
9. Fourcade J., Sun Z., Pagliano O. et al. CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 2012; 72: 887–896.
10. Hellström K.E., Hellström I. Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv. Immunol.* 1974; 18: 209–277.
11. Katakai T., Hara T., Lee J.-H. et al. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immunopatform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Intern. Immunol.* 2004; 16: 1133–1142.
12. Kimpton W.C., McKenzie G.A., Muller H.K. et al. Lymphocyte migration during the development of regional lymph node anergy in experimental tumor growth. *Cell. Immunol.* 1983; 75: 13–21.
13. Takeuchi H., Suchi T., Suzuki R., Sate T. Histological study of immune parameters of regional lymph nodes of gastric cancer patients. *GANN: Jap. J. Cancer Res.* 1982; 73: 420–428.
14. Vitale M., Cantoni C., Pietra G. et al. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* 2014; 44: 1582–1592.