

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАРЕНХИМЫ И СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

¹Ругаль В.И., ¹Бессмельцев С.С., ¹Семенова Н.Ю., ¹Зенина М.Н., ²Одинак О.М.

¹ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
email: bloodscience@mail.ru

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, email: odinacol@mail.ru
тел. (812) 717-67-80

Резюме. Изучена паренхиматозная и стромальная ткань костного мозга в трепанобиоптатах подвздошной кости 95 больных множественной миеломой. Выявлено 5 типов опухолевой инфильтрации: нодулярный, интерстициальный, интерстициально-эндостальный, интерстициально-нодулярный, диффузный. Установлены изменения стромального микроокружения при всех типах поражения костного мозга. Увеличение плотности микрососудов субэндостальных зон, изменение состояния эндостальных стромальных клеток и структуры коллагена кости свидетельствуют о поражении ниши гемопоэтических стволовых клеток. Дефект ниши может быть патогенетическим фактором неопластической трансформации предшественников В-лимфопоэза, а функция ниши может быть направлена на поддержание лейкозного клона.

Ключевые слова: множественная миелома, костный мозг, ниша гемопоэтических стволовых клеток.

PARENCHYMA AND STROMA BONE MARROW STRUCTURAL FEATURES IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

¹Rugal V., ¹Bessmeltsev S., ¹Semenova N., ¹Zenina M., ²Odinak O.

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,

²Militari Medical Academy named after S.M. Kirov,

Summary. Studied parenchymal and stromal tissue of the bone marrow in the trephine biopsies 95 patients with multiple myeloma. Identified 5 types of tumor infiltration: nodular, interstitial, interstitial-endosteal, interstitial-nodular, diffuse. Showed changes of stromal microenvironment in all types of bone marrow. Increase in the density of microvessels subendosteal zones, change of state of endosteal stromal cells and collagen structure of bone showed lesions of niche of hematopoietic stem cells. The defect of niche may be a pathogenetic factor in neoplastic transformation of precursor B-lymphopoiesis and function of niche may be directed to the maintenance of leukemic clone.

Keywords: multiple myeloma, bone marrow, stem cell niche.

Введение

Практически все системные заболевания кроветворной и лимфоидной ткани, включая гемобластозы, характеризуются одновременным, в различной степени выраженным нарушением состояния кроветворной ткани и стромального компонента костного мозга [1-5]. При этом в группе гемобластозов, наряду с поражением паренхимы, особенно ярко проявляются изменения непаренхиматозного, стромального компонента костного мозга у больных множественной миеломой (ММ). Это, прежде всего, связано с выраженными изменениями клеточных и межклеточных структур костной ткани – ключевого элемента стромы формирующего гемопоэз-индуцирующее микроокружение. Особенно важно отметить, что костная ткань, а именно её остеогенные клетки эндостальной зоны создают нишу стволовых клеток гемолимфопоэза [6-9]. Ниша обеспечивает длительное, на протяжении всей жизни организма, самоподдержание стволовых клеток, регулирует их дифференцировочный и пролиферативный потенциал [10-14]. В связи с этим анализ структурных особенностей кроветворной ткани и стромального микроокружения больных ММ является актуальным, так как на основании сведений о морфофункциональном статусе паренхимы и стромы костного мозга представляется возможным получить неизвестные ранее факты, уточняющие патогенез появления и становления неопластического клона В-лимфоцитов при ММ. Кроме того, сведения о взаимоотношениях кроветворной и стромальной ткани костного мозга больных ММ могут быть использованы в целях оценки прогноза заболевания и совершенствования методов лечения.

Целью представленного исследования являлось изучение особенностей опухолевой инфильтрации паренхимы костного мозга больных ММ с одновременной характеристикой перестроек стромальных структур кроветворного микроокружения.

Материал и методы исследования

Материалом исследования послужили цельные фрагменты подвздошной кости 95 больных с впервые выявленной ММ в возрасте 59-72 лет полученные при трепанобиопсии до начала лечения. Трепанаты не менее 2 см были фиксированы в 10% нейтральном забуференном формалине, декальцинировались с использованием декальцинатора на основе ЭДТА. Приготавливались гистологические препараты, 3-5 мкм, которые окрашивались гематоксилин-эозином. Ретикулиновые волокна выявлялись на основе импрегнации серебром. Степень опухолевой инфильтрации оценивалась на основании

иммуногистохимических исследований с использованием RTU антител CD 20, CD 79а, CD138 фирмы DAKO FLEX. При оценке характера опухолевой инфильтрации выделялось пять типов поражения костномозговой паренхимы: нодулярный, интерстициальный, интерстициально-эндостальный, интерстициально-нодулярный, диффузный [15].

Результаты

При гистологическом исследовании трепанобиопсий подвздошной кости больных ММ с первично установленным диагнозом до начала терапии в костном мозге обнаруживалась неоднородная клеточная инфильтрация кроветворной ткани миеломными клетками. Опухолевые клетки в большинстве случаев имели типичную структуру зрелых плазмочитов, в которых не выявлялись ядрышки. Реже миеломные клетки классифицировались как проплазмочиты, плазмобласты. Среди инфильтрирующих паренхиму плазмочитов обнаруживались клетки с Русселевскими тельцами, двоядерные и многоядерные формы. Было выделено пять типов поражения костного мозга: нодулярный, интерстициальный, интерстициально-эндостальный, интерстициально-нодулярный, диффузный. При нодулярном варианте инфильтрации в кроветворной ткани обнаруживался очаговый инфильтрат плазматических клеток, располагавшийся среди жировой ткани с наличием элементов трех ростков гемопоэза на всех стадиях развития. Иногда обнаруживалось несколько узелковых скоплений миеломных клеток. Интерстициальный тип миеломного поражения (рис. № 1) характеризовался наличием плазматических клеток диффузно распределявшихся среди элементов нормального гемопоэза без изменения соотношения с жировой тканью. Число гемопоэтических клеток снижалось в зависимости от интенсивности насыщения костномозговых лакун миеломными клетками. Интерстициально-эндостальная инфильтрация (рис. № 2) сопровождалась наряду с интерстициально расположенными плазмочитами появлением на эндосте многослойного пласта миеломных клеток. При интерстициально-нодулярном варианте поражения костного мозга одновременно с интерстициальными инфильтратами обнаруживались узелковые миеломные очаги, располагающиеся в центральных отделах костномозговых пространств. Диффузный тип поражения (рис. № 3) диагностировался в случаях массивной инфильтрации миеломными клетками интрамедуллярных пространств, которая сопровождалась редукцией жировой ткани с замещением костномозговых пространств плазмочитами и различной степенью угнетения гемопоэза.

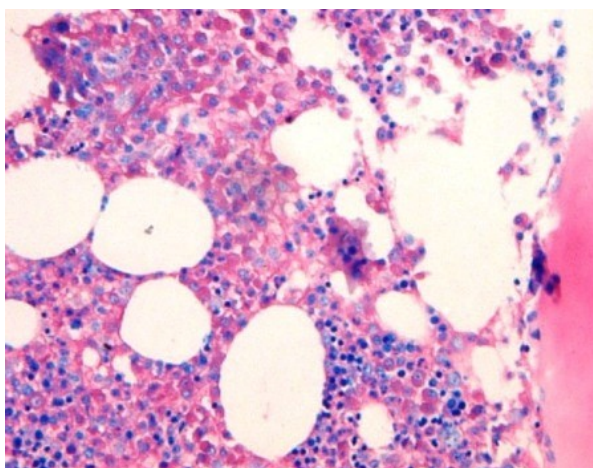


Рис. 1. Трепанобиопсия подвздошной кости. Интерстициальная инфильтрация костного мозга миеломными клетками. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 200.

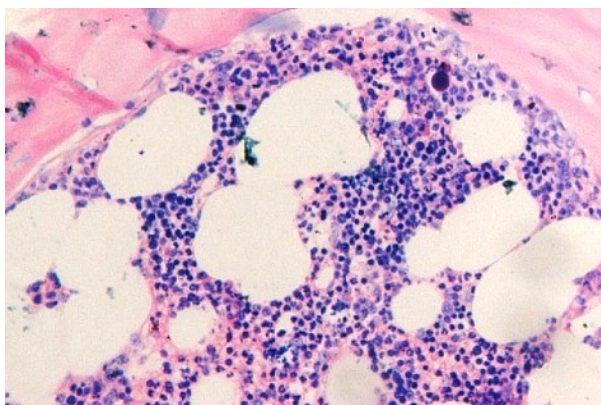


Рис. 2. Трепанобиопсия подвздошной кости. Интерстициально-эндостальная инфильтрация костного мозга миеломными клетками. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 200.

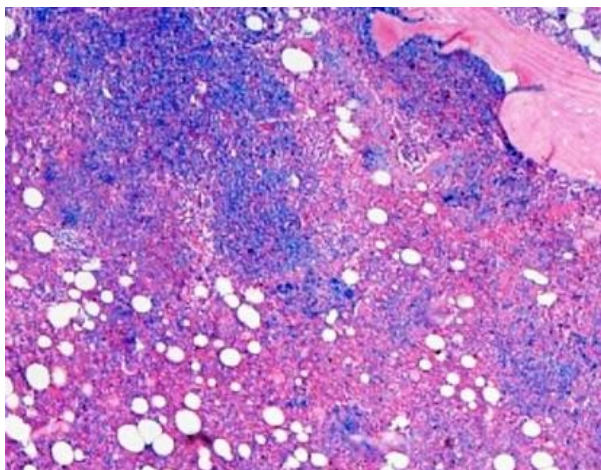


Рис. 3. Трепанобиоптат. Диффузная инфильтрация костного мозга опухолевыми плазмócитами. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 100.

Наряду с морфологической идентификацией миеломных клеток в гистологических препаратах окрашенных гематоксилин-эозином, проводилось иммуногистохимическое исследование для подтверждения гистогенеза опухоли. Особенно информативны были исследования с определением на клетках инфильтратов CD 79 α (рис. № 4) и CD 138 (рис. № 5). Экспрессия CD 138 определялась практически у всех обследованных больных.

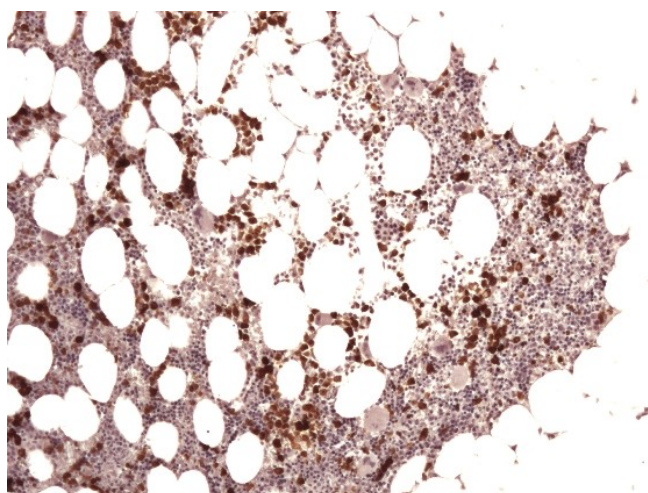


Рис. 4. Трепанобиоптат. Иммуногистохимическое исследование. Эксперсия CD 79α в миеломных клетках. Ув. 200.

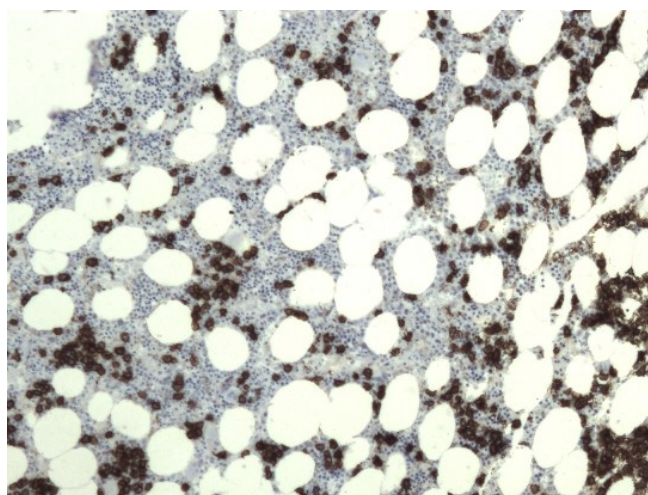


Рис. 5. Трепанобиоптат. Иммуногистохимическое исследование. Эксперсия CD 138 в миеломных клетках. Ув. 200.

Анализ стромальных структур микроокружения при выше указанных вариантах инфильтрации костного мозга свидетельствовал об изменении морфофункционального статуса интрамедуллярной стромы при всех типах поражения кроветворной ткани. Степень этих изменений была неоднозначной. При появлении в интрамедуллярных пространствах нодулярных миеломных очагов, изменения структуры стромальных элементов кроветворного микроокружения в деятельной гемопоэтической ткани вне инфильтратов не выявлялось. Однако, в опухолевых очагах обращало на себя внимание увеличение количества ретикулиновых фибрилл. В части нодулярных инфильтратов регистрировались участки ретикулинового склероза. Явных признаков остеопороза не регистрировалось, однако очаговый лизис кости выявлялся. Интерстициальная инфильтрация костного мозга плазмочитами сопровождалась увеличением интрамедуллярных ретикулярных клеток, наличием ретикулиновых волокон разбросанных в паренхиме без формирования склеротической сети, отмечались участки

деструкции коллагена трабекул без статистически значимого уменьшения объема костной ткани. В эндотелии микрососудов, включая синусы, явных перестроек не наблюдалось. Интерстициально-эндостальный вариант инфильтрации характеризовался, наряду с выше указанными перестройками при интерстициальном поражении, значительными изменениями стромы эндостальных зон кости. В зонах опухолевой инфильтрации эндоста наблюдалось увеличение числа микрососудов, эндотелиоциты которых характеризовались высокой функциональной активностью. Эндостальные стромальные клетки в большинстве были представлены формами с крупными просветленными ядрами. Очаговый лизис кости чаще наблюдался вне зон с усиленным сосудистым рисунком. У больных с интерстициально-нодулярной инфильтрацией костного мозга миеломными клетками обнаруживалось усиление ретикулинового рисунка с очагами ретикулинового склероза в миеломных очагах, участки лизиса костных балок, тенденция к уменьшению объема жировой ткани. Выраженные изменения стромальной ткани костного мозга регистрировались при диффузной инфильтрации. Обнаруживался ретикулиновый склероз, увеличение плотности микрососудов, нарастание числа эндостальных клеток с уплощенными ядрами, нарушение структуры коллагена трабекул костной ткани. Объем костных балок был несколько снижен, однако уменьшение остеогенной ткани было статистически недостоверно ($p > 0.05$).

Обсуждение

До настоящего времени генез ММ окончательно не установлен, а существующие гипотезы не могут объяснить изначальную причину фатального на сегодняшний день заболевания. В связи с этим любые новые сведения относительно расшифровки причины развития ММ весьма актуальны как для понимания природы заболевания, так и для целей терапии и прогноза. Важная роль в получении фактов, способствующих раскрытию патогенеза ММ, принадлежит изучению стромального микроокружения костного мозга. Это прежде всего связано с тем обстоятельством, что ММ является заболеванием в основе которого лежит неопластическая трансформация В-лимфопоэза, а ключевая роль в развитии В-лимфоцитов принадлежит интрамедуллярным стромальным клеткам, которые коммитируют направление их развития, регулируют пролиферацию и дифференцировку. Естественно полагать, что нарушение структуры и функции костномозговых стромальных регуляторов В-лимфопоэза могут вести к нарушению развития лимфоидных клеток-предшественниц, не исключая их малигнизацию. Также известно, что распространенность опухолевого поражения костного мозга и характер инфильтрации кроветворной ткани

плазмочитами является значимым, так как эти факторы во многом определяют дальнейшее течение заболевания и его лечение. Однако, несмотря на тесные взаимосвязи стромы и лимфопоэза, микроокружение костного мозга при ММ в целом, и в зависимости от варианта опухолевой инфильтрации в частности, изучено мало.

Представленные нами данные состояния стромы костного мозга больных ММ свидетельствуют о реакции стромального микроокружения на появление миеломных клеток в интрамедуллярных пространствах губчатого вещества кости. Как мы отмечали ранее, именно в костной ткани присутствует специализированная популяция стромальных остеогенных клеток, формирующих нишу для предшественниц гемолимфопоэза, в которой длительно поддерживается жизнедеятельность стволовых кроветворных клеток и определяются пути их развития в направлении различных клеточных линий. Указанная категория клеток определяет, в частности, развитие стволовых клеток в направлении В-лимфопоэза. Ключевыми структурными компонентами, формирующими нишу, являются эндостальные стромальные клетки губчатого вещества кости, которые совместно с нарабатываемыми ими гуморальными регуляторными факторами и экстрацеллюлярным матриксом при участии микрососудов обеспечивают реализацию генетической программы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, включая лимфоидные предшественники, из которых возникает пул неопластических клеток при ММ. Как следует из наших исследований, отчетливые изменения регистрируются именно в эндостальных зонах, где происходит перестройка соотношения эндостальных клеток, коллагена костных балок и системы микроциркуляции. Это обстоятельство может служить весомым аргументом, указывающим на возможность перестройки функционального потенциала гемопоэтической ниши. На сегодняшний день твердо установлено значение дефектов ниши в расстройствах гемолимфопоэза, вплоть до непосредственного участия стромальных элементов формирующих нишу в появлении лейкозного клона [16-19]. Предыдущие собственные исследования стромы костного мозга при ММ не противоречат этому положению [20]. На наш взгляд вероятность важной, если не ключевой, роли в патогенезе ММ дефектов стромального микроокружения в целом и особенно элементов, определяющих состояние ниши стволовых клеток, очень высока. Прежде всего, это может быть связано с тем, что дефекты ниши могут приводить к нарушению сигнальных путей запуска генетически детерминированной программы пролиферации и дифференцировки нормальных гемопоэтических предшественников, включая клетки-предшественницы В-лимфопоэза. В условиях дисбаланса сигнальных путей вероятность появления неопластического клона крайне высока, а функция ниши

может перейти на поддержание трансформированных плазматических клеток. Дальнейшие исследования стромальной ниши гемопоэтических клеток в динамике течения ММ и в условиях применения современных схем ее терапии позволят получить дополнительные данные о патогенетической роли нишеобразующих структур в расстройствах развития В-лимфоцитов при ММ.

Выводы

1. Выделено пять типов инфильтрации костного мозга плазмочитами при ММ: нодулярный, интерстициальный, интерстициально-эндостальный, интерстициально-нодулярный, диффузный.
2. Независимо от распространенности опухолевого поражения и варианта миеломной инфильтрации отмечается реакция стромального микроокружения.
3. Интенсивность нарушений непаренхиматозного компонента костного мозга наиболее выражена у больных ММ с диффузной инфильтрацией кроветворной ткани.
4. Характер перестроек стромальных элементов костного мозга образующих нишу стволовых клеток у больных ММ может свидетельствовать о патогенетической роли дефектов ниши в нарушении процессов развития лимфоидных клеток, включая участие в неопластической трансформации стволовых клеток с последующим поддержанием лейкозного клона.

Литература

1. Герасимова Л.П., Дризе Н.И., Лубкова О.Н. и др. Нарушения стромального микроокружения у больных с различными заболеваниями системы крови // Гематология и трансфузиология. - 2008. - Т. 53, № 5. - С. 59-62.
2. Duhrsen U., Hossfeld D.K. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases // Ann Hematol. - 1996. – Vol. 73. – P. 53-70.
3. Walkley C.R., Olsen G.H., Dworkin S. et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor γ deficiency // Cell. – 2007. – Vol. 129. – P. 1097-1110.
4. Manier S., Sacco A., Leleu X. et al. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression // J of biomedicine and biotechnology. – 2012. – Vol. 2012. - Id. 157496.
5. Raaijmakers M.H.G.P., Mukherjee S., Guo S. et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia // Nature. – 2010. – Vol. 464. – P. 852-857.

6. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – P. 841-846.
7. Chan C.K.F., Chen C.C., Luppen C.A. et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation // *Nature*. - 2009. – Vol. 457. – P.490-494.
8. Yin T., Li L. The stem cell niches in bone // *J Clin Invest*. – 2006. – Vol 116, № 5. – P. 1195-1201.
9. Askmyr M., Sims N.A., Martin T.J., Purton L.E. What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? // *Trends in endocrinology & metabolism*. – 2009. – Vol. 20, №6. – P. 303-309.
10. Zhang J., Niu C., Ye L. et al. Identification of haematopoietic stem cell niche and control of the niche size // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – P. 836-841.
11. Ellis S.L., Grassinger J., Jones A. et al. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 6. – P. 1516-1524.
12. Oh I.H., Kwon K.-R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations // *Stem cells*. – 2010. – Vol. 28. – P. 1243-1249.
13. Lilly A.J., Johnson W.E., Bunce C.M. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour // *Stem cells international*. – 2011. – Vol. 2011. – Id. 274564.
14. Huang M.-M., Zhu J. The regulation of normal and hematopoietic stem cells by niches // *Cancer Microenviron*. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 295–305.
15. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С. Оценка опухолевой инфильтрации костного мозга при множественной миеломе по результатам исследования трепанобиоптатов // *Вестник гематологию* – 2009. – Т. 5, № 1. – С. 49-50.
16. Tieu K.S., Tieu R.S., Martinez-Agosto J.A., Sehl M.E. Stem cell niche dynamics: from homeostasis to carcinogenesis // *Stem cells international*. – 2012. – Vol. 2012. – Id. 367567.
17. Scadden D.T. The stem cell niche in health and leukemic disease // *Best Pract Res Clin Haematol*. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 19-27.
18. Raaijmakers M.H.G.P. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system // *Haematologica*. – 2011. – Vol. 96, № 7. – P. 1041-1048.
19. Bessmeltsev S., Rugal V. Stormal microenvironment and stem cell niches in multiple myeloma // *Haematologica*. - 2010. – Vol. 95, № 25. – P. 569-570.