

УДК 616.71-018.46-076-006.441

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ ПРИ АГРЕССИВНЫХ И ИНДОЛЕНТНЫХ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ

Домникова Н.П., Непомнящих Г.И., Бакарев М.А., Долгих Т.Ю.,
Качесов И.В., Петрусенко Е.Е.

*НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Новосибирск,
e-mail: pathol@soramn.ru*

Исследованы изменения центрального звена эритрона в зависимости от характера опухолевого поражения костного мозга при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах до начала химиотерапии. Установлено, что изменения эритрона в значительной степени определяются не агрессивностью лимфомы, а типом опухолевой инфильтрации костного мозга. Наиболее выраженная гипоплазия эритроидного ростка с нарушением его созревания развивается при диффузном типе опухолевой инфильтрации. При очаговом типе лимфомной инфильтрации, несмотря на меньшую площадь опухолевой ткани при агрессивных лимфомах по сравнению с индолентными, гипоплазия эритроидного ростка в обеих группах наблюдается с одинаковой частотой. Интерстициальный тип поражения костного мозга не сопровождается изменениями эритрона. Выявлены полиморфные изменения костномозгового микроокружения: у большинства пациентов – снижение относительной площади жировой ткани, у 75% – гладкая резорбция костной ткани, у 50% – миелофиброз.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, костный мозг, трепанобиопсия, эритрон, миелофиброз

STRUCTURAL ANALYSIS OF TREPHINE BIOPSIES IN NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

Domnikova N.P., Nepomnyashchikh G.I., Bakarev M.A., Dolgikh T.Y.,
Kachesov I.V., Petrusenko E.E.

*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS, Novosibirsk,
e-mail: pathol@soramn.ru*

The changes of erythron were studied in association with the character of bone marrow tumor infiltration in patients with indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphomas before the onset of chemotherapy. We found that these changes were rather associated with the type of bone marrow infiltration than with the aggressiveness of lymphoma. The most profound erythroid hypoplasia with dismaturation of erythroid germ developed in cases of diffuse bone marrow infiltration. In cases with focal infiltration, erythroid hypoplasia was equally detected both in indolent and aggressive forms despite the smaller area of bone marrow tumor infiltration in aggressive lymphomas. Polymorphic changes of the bone marrow microenvironment were observed: myelofibrosis in half of the patients with non-Hodgkin's lymphoma, smooth bone resorption – in 3/4, and virtually all patients had a decrease of the relative ratio of adipose tissue.

Keywords: non-Hodgkin's lymphoma, bone marrow, trephine biopsy, erythron, myelofibrosis

Нарушения в системе эритрона и развитие анемии, встречающейся у 60–80% больных с неходжкинскими лимфомами, ассоциируются с неблагоприятным прогнозом этих заболеваний, снижением чувствительности опухоли к химио- и лучевой терапии, поражением внутренних органов вследствие гипоксии и микроциркуляторных нарушений [7, 8, 15].

Необходимость выбора адекватных путей коррекции изменений эритропоза для снижения частоты осложнений и повышения эффективности противоопухолевого лечения определяет актуальность изучения закономерностей изменений в системе эритрона при лимфопролиферативных заболеваниях. Значимую роль среди многообразных механизмов угнетения эритропоза играет прямое цитотоксическое влияние опухолевых клеток на клетки эритрона или опосредованное действие провоспалительных цитокинов [3, 9]. Большое значение в регуляции эритропоза отводится костномозговому микроокружению [1].

Цель исследования – характеристика эритроидного ростка при неходжкинских лимфомах во взаимоотношении с другими клеточными и тканевыми элементами костного мозга, в том числе с опухолевой тканью.

Материал и методы исследования

Обследовано 53 пациента с агрессивными и индолентными неходжкинскими лимфомами с опухолевым поражением костного мозга (31 мужчина, 22 женщины, от 26 до 76 лет, средний возраст $55,07 \pm 1,96$ года), находившихся в ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» с 2007 по 2010 год. Диагноз лимфомы устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ (2001). Группа агрессивных лимфом (19 пациентов) была представлена диффузной В-крупноклеточной, мантийноклеточной, Т-клеточной периферической и лимфомой Беркитта. Группа индолентных лимфом (34 пациента) включала неходжкинскую лимфому из малых лимфоцитов, лимфоплазмочитарную лимфому и MALT-экстранодальную. Пациенты с лимфомами были обследованы до начала химиотерапии. Контрольную группу составили 10 пациентов (6 мужчин, 4 женщины в возрасте от 38 до 65 лет, средний возраст $53,5 \pm 2,61$ года), у которых диагноз гемобластоза был исключен после комплексного обследования.

Парафиновые срезы трепанобиоптатов подвздошной кости толщиной 4 мкм исследовали в лабораторном микроскопе Axioscop 40 (Zeiss). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Canon и компьютерной программы AxioVision Rel. 4.7.1. В препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, в 20 случайных полях зрения при увеличении 400 определяли относительную площадь гемопоэтической, жировой и костной ткани, синусоидов, а также опухолевой ткани. Устанавливали тип опухолевого поражения костного мозга (лимфомной инфильтрации) [10].

Для количественной оценки эритронов подсчитывали ядросодержащие клетки. При увеличении 630 определяли средний диаметр не менее чем 100 клеток каждой популяции. Численную плотность клеток оценивали по формуле [6]: $N_V = N_A / (D + t)$, где N_A – число ядерных профилей в тестовой площади; D – диаметр ядра; t – толщина среза. Полученное число клеток в тестовой площади переводили в число клеток в 1 мм³. Степень миелофиброза устанавливали согласно шкале Европейского консенсуса [18] в срезах, окрашенных по ван Гизону и импрегнированных серебром по

Гомори. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS (версия 17.0).

Результаты исследования и их обсуждение

При агрессивных и индолентных лимфомах в трепанобиоптатах увеличена относительная площадь клеточного костного мозга, включавшего как нормальные, так и опухолевые клетки. Относительная площадь жировой и костной ткани уменьшена в обеих группах пациентов с лимфомами по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Костная ткань в 75% случаев подвергалась гладкой резорбции. Относительная площадь синусоидов у пациентов с лимфомами не отличалась от показателя контрольной группы. В половине трепанобиоптатов выявлен миелофиброз; преобладал миелофиброз 1-й степени, в остальных случаях – одинаково часто 2-й и 3-й степени.

Таблица 1

Соотношение тканей костного мозга в трепанобиоптатах подвздошной кости при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах с поражением костного мозга ($M \pm m$)

Относительная площадь:	Агрессивные лимфомы (n = 19)	Индолентные лимфомы (n = 34)	Достоверность различий, p	Контрольная группа (n = 10)
Клеточного костного мозга, %	55,86 ± 9,00*	55,67 ± 5,40*	0,986	36,30 ± 2,56
Жировой ткани, %	26,29 ± 9,07*	25,90 ± 5,42*	0,972	38,50 ± 3,14
Костной ткани, %	12,43 ± 2,13*	12,33 ± 0,95*	0,963	20,0 ± 2,60
Синусоидов, %	5,43 ± 0,61	5,90 ± 0,36	0,998	5,20 ± 0,97

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Наиболее частым вариантом опухолевого поражения костного мозга (более чем в половине случаев) при агрессивных и индолентных лимфомах являлась очаговая инфильтрация – наличие множественных межтрабекулярных или паратрабекулярных скоплений опухолевых клеток. Относительная площадь опухолевой ткани при очаговом типе лимфомного поражения костного мозга у пациентов с индолентными неходжкинскими лимфомами в 2,5 раза превышала таковую в группе агрессивных лимфом

($p = 0,032$) (табл. 2). У 26,4% пациентов с лимфомами имел место диффузный тип опухолевого поражения костного мозга, с массивной лимфомной инфильтрацией, заполняющей более 50% межбалочного пространства при значительном сокращении жировой и кроветворной тканей. Интерстициальный тип опухолевого поражения костного мозга выявлен у 13,2% пациентов – лимфомные клетки локализовались среди клеточных элементов костного мозга без нарушения его нормальной архитектоники.

Таблица 2

Относительная площадь опухолевой ткани при различных типах лимфомной инфильтрации костного мозга при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах ($M \pm m$)

Тип опухолевой инфильтрации костного мозга	Относительная площадь опухолевой ткани, %		Достоверность различий, p
	агрессивные лимфомы (n = 19)	индолентные лимфомы (n = 34)	
Диффузный тип	52,67 ± 9,30	59,14 ± 8,96	0,167
Очаговый тип	13,50 ± 2,16	31,38 ± 5,34	0,032
Интерстициальный тип	5,0 ± 2,0	4,67 ± 2,90	0,988

По данным количественного анализа клеточных популяций костного мозга (табл. 3), общее количество костномозговых клеток как при агрессивных, так и при индолентных лимфомах превышало таковое в контрольной группе ($p < 0,05$) и составило $105,99 \pm 10,12 \cdot 10^3$ и

$107,10 \pm 8,60 \cdot 10^3$ клеток/мм³ соответственно. Важно отметить, что при неходжкинских лимфомах численность гранулоцитов и эритроидных клеток была достоверно меньшей, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), и не зависела от агрессивности лимфомы.

Таблица 3

Численность миелокариоцитов при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах с поражением костного мозга ($M \pm m$)

Показатели	До лечения		Достоверность различий, p	Контрольная группа ($n = 10$)
	агрессивные лимфомы ($n = 10$)	индолентные лимфомы ($n = 10$)		
Общая клеточность костного мозга, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$105,99 \pm 10,12^*$	$107,10 \pm 8,60^*$	0,795	$90,0 \pm 7,0$
Число клеток гранулоцитарного ряда, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$45,52 \pm 6,15^*$	$44,01 \pm 7,31^*$	0,623	$60,03 \pm 8,54$
Общее число эритроидных клеток, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$15,01 \pm 1,24^*$	$14,18 \pm 1,50^*$	0,194	$18,36 \pm 2,01$
Эритробласты, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$1,02 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,05$	0,058	$0,9 \pm 0,51$
Нормоциты базофильные, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$1,80 \pm 0,13^*$	$5,36 \pm 1,0^*$	<0,001	$3,61 \pm 1,03$
Нормоциты полихроматофильные, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$9,54 \pm 0,99^*$	$6,08 \pm 1,01^*$	<0,001	$12,32 \pm 1,36$
Нормоциты оксифильные, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$0,53 \pm 0,04^*$	$0,50 \pm 0,01^*$	0,034	$0,63 \pm 0,02$
Мегалобласты, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$2,12 \pm 1,06^*$	$1,17 \pm 0,02^*$	0,011	$0,90 \pm 0,10$
Число нормальных лимфоидных клеток, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$17,26 \pm 4,32^*$	$18,21 \pm 3,37^*$	0,590	$10,71 \pm 1,56$
Число атипичных лимфоцитов, $\times 10^3/\text{мм}^3$	$22,38 \pm 5,06$	$29,63 \pm 5,0$	0,005	-
Число мегакариоцитов, /мм ³	$45,0 \pm 4,32^*$	$42,0 \pm 6,04^*$	0,205	$60,0 \pm 9,85$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Гипоплазия эритрона при агрессивных лимфомах характеризовалась редукцией всех клеточных популяций, при индолентных лимфомах – увеличением количества базофильных нормоцитов при сокращении числа полихроматофильных и оксифильных клеток по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Кроме того, число мегалобластов увеличено относительно контрольной группы в большей степени при агрессивных лимфомах, чем при индолентных ($p = 0,011$).

При неходжкинских лимфомах, независимо от агрессивности, количество нормальных лимфоидных клеток превышало показатель контрольной группы ($p < 0,05$); количество атипичных лимфоцитов при индолентных лимфомах превышало показатель агрессивных ($p = 0,005$).

Проведено исследование состояния эритрона в зависимости от типа опухолевого поражения костного мозга (рисунок). При диффузном типе лимфомной инфильтрации костного мозга во всех случаях отмечалась редукция эритроидного ростка в сочетании с гипоплазией гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков. При очаговом типе опухолевой инфильтрации костного мозга состояние эритрона варьировало и определялось агрессивностью лимфомы.

При индолентных лимфомах у большинства пациентов отмечена гипоплазия эритроидного ростка, реже наблюдалась гипер-

плазия всех клеточных популяций эритрона (по сравнению с контрольной группой) или гиперплазия с нарушением созревания эритрона (относительным увеличением количества эритробластов и базофильных нормоцитов). В нескольких случаях количество эритроидных клеток не отличалось от контрольной группы.



Особенности состояния эритрона при неходжкинских лимфомах в зависимости от типа опухолевого поражения костного мозга

При агрессивных лимфомах с очаговым типом опухолевого поражения костного мозга почти во всех случаях выявлена гипоплазия эритроидного ростка, несмотря на меньшую площадь опухолевой ткани по сравнению с индолентными лимфомами с очаговой инфильтрацией костного мозга. Как при агрессивных, так и индолентных лимфомах редукция эритрона часто сочеталась с гипоплазией гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков.

Интерстициальный тип поражения костного мозга при агрессивных и индолентных лимфомах не сопровождался изменениями эритрона, а также гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков.

Таким образом, проведенные нами исследования демонстрируют, что наиболее часто как при агрессивных, так и при индолентных лимфомах выявляется очаговый тип опухолевой инфильтрации костного мозга (60,4%), реже диффузный (26,4%) и интерстициальный (13,2%) типы, что имеет прогностическую значимость при неходжкинских лимфомах [12, 13]. Обнаружено, что при очаговом типе поражения костного мозга при индолентных лимфомах относительная площадь опухолевой ткани превышает таковую в группе агрессивных лимфом. Высокая частота опухолевого поражения костного мозга при индолентных В-клеточных лимфомах, вероятно, обусловлена более выраженной способностью опухолевых клеток к костномозговой инвазии, что связано с экспрессией молекул адгезии, обеспечивающих тропность к гемопоэтической ткани и строме костного мозга [10, 17].

Работы по изучению влияния опухолевой ткани на эритропоэз при агрессивных и индолентных лимфомах немногочисленны. При лейкемизации костного мозга описан «синдром занятого места» [4] с гипоплазией нормальных ростков кроветворения и уменьшением площади жировой ткани, что характерно для диффузного типа лимфомного поражения костного мозга с максимальной площадью опухолевой ткани. С другой стороны, угнетение эритропоэза нельзя интерпретировать исключительно вытеснением нормального кроветворения опухолевой тканью.

Среди механизмов, негативно влияющих на костномозговое звено эритрона, ведущее место часто отводится недостаточной продукции эритропоэтина, влиянию провоспалительных цитокинов, индуцирующих неэффективный эритропоэз, нарушению метаболизма железа [3, 11, 16]. По-видимому, перечисленные факторы имеют большее значение при агрессивных лимфомах, чем при индолентных.

Нами ранее показаны отличия во взаимосвязи степени опухолевого поражения костного мозга и количественных показателей эритрона при агрессивных и индолентных лимфомах: прямая связь между увеличенным количеством опухолевых клеток и гипоплазией эритроидного ростка при индолентных лимфомах и отсутствие такой связи при агрессивных лимфомах [2]. Так, при очаговом типе лимфомного поражения костного мозга у пациентов с агрессивными и индолентными лимфомами с одинаковой частотой наблюдается гипоплазия эритроидного ростка, несмотря на меньшую площадь опухолевой ткани при агрессивных лимфомах по сравнению с индолентными.

Механизмы миелофиброза и его влияние на эритрон при неходжкинских лимфомах имеют важное значение для понимания роли костномозгового микроокружения в регуляции гемопоэза [5, 10, 14].

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что наиболее часто как при агрессивных, так и при индолентных лимфомах выявляется очаговый тип опухолевой инфильтрации костного мозга, реже диффузный и интерстициальный типы. Изменения центрального звена эритрона в значительной степени определяются не агрессивностью лимфомы, а фактом опухолевой инфильтрации костного мозга и ее типом. Наиболее выраженная гипоплазия эритроидного ростка с нарушением его созревания развивается при диффузном типе опухолевой инфильтрации костного мозга. При очаговом типе лимфомной инфильтрации, несмотря на меньшую площадь опухолевой ткани при агрессивных лимфомах по сравнению с индолентными, гипоплазия эритроидного ростка в обеих группах наблюдается с одинаковой частотой. Интерстициальный тип поражения костного мозга при агрессивных и индолентных лимфомах не сопровождается изменениями эритрона. Выявлены полиморфные изменения костномозгового микроокружения: у большинства пациентов – снижение относительной площади жировой ткани, у 75% – гладкая резорбция костной ткани, у 50% – миелофиброз.

Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Динамическая теория регуляции кроветворения и роль цитокинов в регуляции гемопоэза // Медицинская иммунология. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 487–497.
2. Особенности гемограммы и миелограммы при прогрессировании неходжкинских лимфом / Н.П. Домникова, В.В. Дегтярёва, О.В. Мухин, Л.М. Непомнящих // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 95–99.

3. Баланс цитокинов при лимфопролиферативных заболеваниях / Н.П. Домникова, Е.Е. Петрусенко, О.В. Решетников и др. // Сибирский научный вестник. – 2010. – Вып. XIII. – С. 40–42.
4. Морозова В.Т. Лейкозы – болезни стромы кроветворных органов (гипотеза) // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 6. – С. 3–13.
5. Морозова В.Т. Роль взаимодействия стромальной и гемопоэтической ткани в патологии кроветворения // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 8. – С. 33–36.
6. Морфометрический и стереологический анализ миокарда. Тканевая и ультраструктурная организация: метод. реком / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушников, Л.В. Колесникова и др. – Новосибирск: СО АМН СССР, 1984. – 160 с.
7. Погорелов В.М., Козинец Г.И. Морфологические маркеры пролиферации и апоптоза опухолевых клеток // Гематология и трансфузиология. – 2008. – № 4. – С. 15–20.
8. Поспелова Т.И., Лямкина А.С. Анемия при лимфомах. – Новосибирск: НГМУ, 2008. – 139 с.
9. Туркина А.Г. Хронический миелолейкоз: руководство по гематологии в 3 т. / под ред. А.И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1. – С. 251–256.
10. Чигринова Е.В., Павловская А.И. Современные возможности диагностики поражения костного мозга при неходжкинских лимфомах на материале трепанобиоптата // Онкогематология. – 2006. – № 1–2. – С. 38–49.
11. Adamson J.W. The anemia of inflammation/malignancy: mechanism and management // Haematology. – 2008. – Vol. 59. – P. 159–165.
12. Arber D.A., George T.I. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma. Frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens // Am. J. Surg. Pathol. – 2005. – Vol. 29. – P. 1549–1557.
13. Kent S.A., Variakojis D., Peterson L.C. Comparative study of marginal zone lymphoma involving bone marrow // Am. J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 117. – P. 698–708.
14. Krebsbach P.H., Kuznetsov S.A., Bianco P., Gehron R.P. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application // Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. – 1999. – Vol. 10. – P. 165–170.
15. Ludwig H., Van Belle S., Barrett-Lee P. et al. The European Cancer Anemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anemia in cancer patients // Eur. J. Cancer. – 2004. – Vol. 40. – P. 2293–2306.
16. Spivak J.L., Gascon P., Ludwig H. Anemia management in oncology and haematology // The oncologist. – 2009. – Vol. 14, suppl. 1. – P. 43–56.
17. Thaler J., Dietze O., Denz H. et al. Bone marrow diagnosis in lymphoproliferative disorders: comparison of results obtained from conventional histomorphology and immunohistology // Histopathology. – 1991. – Vol. 18. – P. 495–504.
18. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F. et al. European consensus for grading of bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // Haematologica. – 2005. – Vol. 90. – P. 1128–1132.

Рецензенты:

Горчаков В.Н., д.м.н., профессор, зав. лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Вавилин В.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией метаболизма лекарств НИИ молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 28.03.2011.