

УДК: 616-006.441-076.5

### МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ ПРИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ

**Н.П. Домникова, Г.И. Непомнящих, Т.Ю. Долгих, Е.Е. Петрусенко,  
И.В. Качесов**

*НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, г. Новосибирск  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, e-mail: pathol@soramn.ru*

Исследованы изменения эритрона при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах в зависимости от типа опухолевой инфильтрации костного мозга до начала химиотерапии. Независимо от агрессивности лимфомы установлена гипоплазия эритроидного ростка с нарушением его созревания, наиболее выраженная при диффузном типе опухолевой инфильтрации костного мозга. При исследовании степени опухолевого поражения костного мозга и количественных показателей эритрона установлено, что при очаговом типе лимфомной инфильтрации костного мозга с одинаковой частотой наблюдается гипоплазия эритроидного ростка, несмотря на меньшую площадь опухолевой ткани при агрессивных лимфомах по сравнению с индолентными. 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.

#### MORPHOLOGICAL STUDY OF TREPHINE BIOPSIES IN NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

N.P. Domnikova, G.I. Nepomnyashchikh, T.Yu. Dolgikh, E.E. Petrusenko, I.V. Kachesov  
*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology, Siberian Branch of RAMS  
2, Timakova str., 630117-Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru*

The changes of erythron depending on the type of the bone marrow infiltration in patients with non-Hodgkin's lymphoma were studied before the onset of chemotherapy. We found that regardless of the aggressiveness of lymphoma, erythroid hypoplasia with dismaturation of erythroid germ developed, most profound in cases of diffuse bone marrow infiltration. In cases of focal infiltration, a clear link between the increase in the number of tumor cells and erythroid hypoplasia was seen in indolent lymphomas, but no such association was found in aggressive lymphomas. The 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.

Key words: 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].

**Целью исследования** явилась 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

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 г. 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 Cannon 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 эритрона 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  $1 \text{ мм}^3$ . 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 и 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 (рис. 1). Относительная площадь синусоидов у пациентов с лимфомами не отличалась от показателя контрольной группы. В половине трепанобиоптатов выявлен миелофиброз; преобладал миелофиброз I степени, в остальных случаях – одинаково часто II и III степени (рис. 2, 3).

Наиболее частым вариантом опухолевого поражения костного мозга (более чем в половине случаев) при агрессивных и индолентных

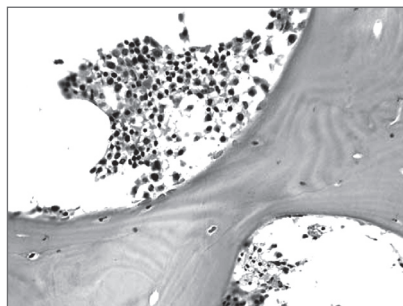


Рис. 1. Микрофото. Диффузная В-крупноклеточная лимфома. Трепанобиоптат подвздошной кости: гладкая резорбция костной балки. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

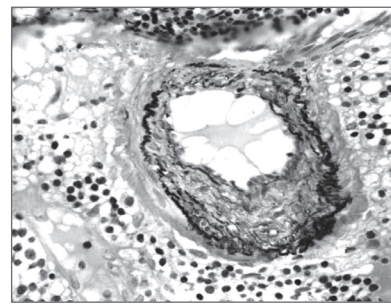


Рис. 2. Микрофото. Диффузная В-крупноклеточная лимфома. Трепанобиоптат подвздошной кости: периваскулярный миелофиброз III степени. Окраска по ван Гизону.  $\times 630$

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

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

лимфомах являлась очаговая инфильтрация – наличие множественных межтрабекулярных или паратрабекулярных скоплений опухолевых клеток. Относительная площадь опухолевой ткани при очаговом типе лимфомного поражения костного мозга в 2,5 раза превышала таковую у пациентов с индолентными неходжкинскими лимфомами по сравнению с агрессивными ( $p = 0,032$ ) (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 кровеносной тканей (рис. 4). Интерстициальный тип опухолевого поражения костного мозга выявлен у 13,2 % пациентов – лимфомные клетки локализовались среди клеточных элементов костного мозга без нарушения его нормальной архитектоники.

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 ( $p < 0,05$ ), что составило  $105,99 \pm 10,12 \times 10^3$  и  $107,10 \pm 8,60 \times 10^3$  клеток/мм<sup>3</sup> 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.

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 нормаль-

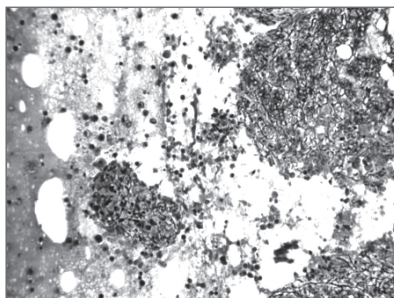


Рис. 3. Микрофото. Неходжкинская мелкоклеточная лимфома. Трепанобиоптат подвздошной кости: миелофиброз II степени. Импрегнация серебром по Гомори.  $\times 400$

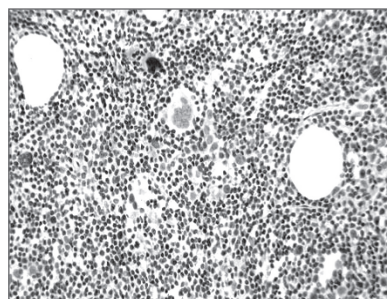


Рис. 4. Микрофото. Неходжкинская мелкоклеточная лимфома. Трепанобиоптат подвздошной кости: диффузный тип опухолевой инфильтрации костного мозга. Сокращение относительной площади жировой ткани. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

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, р |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                                            | Агрессивные лимфомы (n=19)             | Индолентные лимфомы (n=34) |                           |
| Диффузный                                  | $52,67 \pm 9,30 \%$                    | $59,14 \pm 8,96 \%$        | 0,167                     |
| Очаговый                                   | $13,50 \pm 2,16 \%$                    | $31,38 \pm 5,34 \%$        | 0,032                     |
| Интерстициальный                           | $5,0 \pm 2,0 \%$                       | $4,67 \pm 2,90 \%$         | 0,988                     |

ных 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 (рис. 5). 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 гиперплазия 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.

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 при 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 относительная площадь опухолевой ткани при очаговом типе поражения костного мозга превышает таковую при индолентных лимфомах по сравнению с агрессивными. 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].



Рис. 5. Особенности состояния эритрона при неходжкинских лимфомах в зависимости от типа опухолевого поражения костного мозга



Таблица 3

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

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

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Работы по изучению влияния опухолевой ткани на эритропоэз при агрессивных и индолентных лимфомах немногочисленны. При лейкомизации 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 отличие 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].

#### ЛИТЕРАТУРА

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. Домникова Н.П., Дегтярёва В.В., Мухин О.В., Непомнящих Л.М. Особенности гемограммы и миелограммы при прогрессировании неходжкинских лимфом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. Т. 140, № 7. С. 95–99.
3. Домникова Н.П., Петрусенко Е.Е., Решетников О.В. и др. Баланс цитокинов при лимфопролиферативных заболеваниях // 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 гемопозитической ткани в патологии кроветворения // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. № 8. С. 33–36.
6. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Колесникова Л.В. и др. Морфометрический и стереологический анализ миокарда. Тканевая и ультраструктурная организация: Методические рекомендации. 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.

Поступила 15.03.11