

КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА  
И ЛЕЧЕНИЕ ЛИМФОИДНЫХ  
ОПУХОЛЕЙ

## Роль дефектов кроветворной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза

*Н.Ю. Семенова, С.С. Бессмельцев, В.И. Ругаль*

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

### РЕФЕРАТ

**Актуальность и цели.** Нишеобразующие элементы костного мозга и лимфоидных органов играют существенную роль в патогенезе хронического лимфолейкоза (ХЛЛ). Цель — определить морфофункциональные особенности стромальных элементов кроветворного и лимфоидного микроокружения, участвующих в формировании ниш гемопоэтических стволовых клеток и лимфоидных клеток-предшественниц.

**Методы.** Материалом исследования послужили гистологические препараты костного мозга и лимфатических узлов 112 пациентов с ХЛЛ (64 мужчины, 48 женщин). В группу сочетанного анализа вошло 45 пациентов. Медиана возраста составила 60 лет. Контрольную группу составили 50 человек: трепанобиопсия подвздошной кости выполнена 30 здоровым лицам, а биопсия лимфатических узлов — 20 участникам с реактивной лимфаденопатией. При изучении гистологических структур применялись стандартные окраски: гематоксилин и эозин, азури-II и эозин, импрегнация серебром, по Массону. Иммуногистохимический анализ проводили с использованием панели первичных антител и полимерной системы визуализации Dako по протоколам окрашивания.

**Результаты.** При анализе 96 трепанобиоптатов мы выделили три типа инфильтрации костного мозга: нодулярный (18,8 %,  $n = 18$ ), интерстициальный (27 %,  $n = 26$ ) и диффузный (54,2 %,  $n = 52$ ). Нодулярная и интерстициальная инфильтрация костного мозга свидетельствуют о более благоприятном течении ХЛЛ в сравнении с диффузным типом его поражения. Обнаруженные морфологические особенности стромы костного мозга у больных ХЛЛ могут быть обусловлены как первичным поражением кроветворного микроокружения, так и цитокиновым дисбалансом в результате воздействия на строму лейкозного клона. При морфологическом исследовании биоптатов лимфатических узлов у больных ХЛЛ во всех случаях отмечалось нарушение гистоархитектоники компонентов лимфоидной ткани. В лимфатических узлах при ХЛЛ мы наблюдали увеличение количества мелких сосудов на

LYMPHOID  
MALIGNANCIES

## Role of Defects of Hematopoietic and Lymphoid Niches in Genesis of Chronic Lymphocytic Leukemia

*NYu Semenova, SS Bessmel'tsev, VI Rugal'*

Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

### ABSTRACT

**Background & Aims.** Niche-forming elements of the bone marrow and lymphoid organs play an important role in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemias. The aim is to determine multifunctional characteristics of stromal elements of the hematopoietic and lymphoid microenvironment involved in formation of a niche of hematopoietic stem cells and lymphoid precursor cells.

**Methods.** Histological specimens of the bone marrow and lymph nodes of 112 CLL patients (64 men and 48 women) were investigated. 45 patients were included in the combined analysis group. The age median was 60 years. 50 volunteers were included in the control group: trepanobiopsy of the iliac area was performed in 30 healthy subjects, and lymph node biopsy was performed in 20 patients with reactive lymphadenopathy. Standard staining (hematoxylin-eosin, azure-II-eosin, silver impregnation, Masson stain) was used for histological studies. The immunohistochemical analysis was performed using the primary antibody panel and the polymer visualization system Dako according to staining protocol.

**Results.** While analyzing 96 trepanobiopsates, we isolated three types of bone marrow infiltration: nodular (18.8 %,  $n = 18$ ), interstitial (27 %,  $n = 26$ ) and diffuse (54.2 %,  $n = 52$ ). Nodular and interstitial bone marrow infiltrations reflect a more favorable course of CLL as compared to the diffuse type. The morphological characteristics of the bone marrow stroma of CLL patients may be caused by both primary impairment of the hematopoietic microenvironment, and cytokine disbalance resulting from the effect on the stroma of the leukemic clone. The morphological examination of lymph node biopsate of CLL patients demonstrated impairment of histoarchitectonics of lymphoid tissue elements in all cases. In lymph nodes of CLL patients, we demonstrated the increased number of small vessels on the background of decreased expression of extracellular matrix protein expression: IV type collagen, laminin, and desmin. Disintegration of lymph node follicular dendritic cells network was demonstrated.

фоне сниженной экспрессии белков внеклеточного матрикса — коллагена IV типа, ламинина и десмина. Выявлена дезинтеграция сети фолликулярных дендритных клеток лимфатических узлов.

**Заключение.** Выяснение характера воздействия стромы на гемопоэз остается актуальной задачей для гематологии. Для решения проблемы регуляторных воздействий целесообразно использовать морфологические методы, включая иммуногистохимическое исследование.

**Ключевые слова:** гемопоэтические стволовые клетки, костный мозг, ниша гемопоэтических стволовых клеток, микроокружение, лимфоидная ниша, фолликулярные дендритные клетки.

**Получено:** 8 октября 2015 г.

**Принято в печать:** 10 января 2016 г.

*Для переписки:* Наталья Юрьевна Семенова, канд. биол. наук, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; тел.: +7(812)717-09-95; e-mail: sciencerugal@gmail.com

*Для цитирования:* Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Роль дефектов кроветворной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. 2016;9(2):176–90.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190

**Conclusion.** Examination of the nature of the effect of stroma on hematopoiesis remains an urgent hematological problem. In order to solve the problem of regulatory influence, the use of morphological methods is recommended, including the immunohistochemical analysis.

**Keywords:** hematopoietic stem cell, bone marrow, hematopoietic stem cell niche, microenvironment, lymphoid niche, follicular dendritic cells.

**Received:** October 8, 2015

**Accepted:** January 10, 2016

*For correspondence:* Natal'ya Yur'evna Semenova, PhD, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; Tel.: +7(812)717-09-95; e-mail: sciencerugal@gmail.com

*For citation:* Semenova NYu, Bessmel'tsev SS, Rugal' VI. Role of Defects of Hematopoietic and Lymphoid Niches in Genesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2016;9(2):176–90 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190

Отличительной чертой хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) — одного из наиболее частых вариантов злокачественных лимфопрлиферативных заболеваний взрослых — является сочетанное опухолевое поражение миелоидной и лимфоидной тканей, особенно ярко проявляющееся при наличии лимфаденопатии. На основании этого положения естественно предполагать, что установление патогенетических механизмов лимфоидной малигнизации требует анализа как кроветворной, так и лимфоидной ткани, которые тесно взаимосвязаны и по существу представляют собой единый миелолимфоидный комплекс. К тому же анализ указанных тканей был бы недостаточным без знаний о состоянии их стромального микроокружения, и особенно тех структур, которые формируют нишу гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и стволовых клеток лимфоидной направленности. При изучении структуры костного мозга подвздошной кости и строения лимфатических узлов больных ХЛЛ была поставлена задача — установить морфофункциональные особенности паренхимы и стромальных элементов кроветворного и лимфоидного микроокружения, участвующих в формировании ниши ГСК и лимфоидных клеток-предшественниц, а также оценить роль изменений состояния нишеобразующих структур в патогенезе заболевания. Полученные в ходе исследований данные отчетливо свидетельствуют о нарушении морфофункциональных свойств структур гемопоэтической ниши в костном мозге и элементов лимфоидной ниши в лимфатических узлах у больных ХЛЛ. В связи с этим представляется возможным расширить существующие представления о патогенезе ХЛЛ концептуальным положением об участии в этом процессе структурных и функциональных перестроек нишеобразующих элементов костного мозга и лимфатических узлов, непосредственно влияющих на развитие

ГСК и их коммитированных в лимфоидном направлении потомков. Одновременно полученные сведения о морфофункциональных особенностях гемопоэтической и лимфоидной ниш создают предпосылки для более точного прогнозирования течения заболевания, совершенствования лечения и оценки его эффективности [1].

Система лимфопоэза стоит на первом месте среди всех тканей и органов по темпам клеточного самообновления. В такой ситуации для поддержания клеточного баланса прежде всего требуется определенное количество стволовых клеток с закрепленной генетической программой их развития в кроветворном и лимфоидном направлениях, а также наличие дополнительных механизмов, регулирующих реализацию пролиферативного и дифференцировочного потенциала стволовых клеток, среди которых ключевая роль принадлежит регуляторным факторам кроветворной стромы. У взрослых гемопоэз ограничивается костной тканью. В ней локальные регуляторные механизмы развития клеток-предшественниц лимфопоэза определяются гемопоэзиндуцирующим микроокружением, в котором первостепенное значение имеют стромальные клетки. Из широкого спектра клеточных элементов микроокружения мы выделили для анализа ключевые образования, играющие основную роль в жизнедеятельности стволовых кроветворных клеток. Мы исходили из положения, что длительное самоподдержание стволовых клеток и реализация генетической программы развития возможны только при условии их пребывания в специфическом микроокружении, которое формирует для них особую нишу. Ниша является не просто локальным местопребыванием стволовых клеток, а имеет структурно-анатомические и функциональные характеристики [1, 2]. Вне ниши стволовые кроветворные клетки не способны выполнять свои функции. Клеточные и внеклеточные образования губчатой кости

**Таблица 1.** Характеристика пациентов с хроническим лимфолейкозом

Показатель	Пациенты, n = 112
Возраст, лет	
Диапазон	49–73
Медиана	60
Пол, n	
Мужчины	64
Женщины	48
Стадия по Rai, n	
0–I	21
II	35
III–IV	56

эндостальных зон, система микрососудов и внеклеточный матрикс являются структурами, формирующими нишу клеток-предшественниц лимфопоэза. Коммитированные лимфоидные предшественники мигрируют из костного мозга в лимфоидные органы, где при непосредственном влиянии стромального компонента лимфоидной ткани происходит их дальнейшее развитие.

Несмотря на то что для большинства исследователей ХЛЛ является неопластическим процессом, вопрос о том, что представляет собой ХЛЛ — злокачественную опухоль крови или болезнь, обусловленную нарушением нормальной регуляции лимфопоэза, до сих пор остается нерешенным окончательно [3, 4]. В связи с этим любые новые сведения относительно расшифровки причины развития ХЛЛ весьма актуальны как для понимания природы заболевания, так и для целей терапии и прогноза. Важная роль в получении фактов, способствующих раскрытию патогенеза ХЛЛ, принадлежит изучению стромального микроокружения костного мозга. Согласно одной из гипотез, в основе развития ХЛЛ лежит неопластическая трансформация в системе В-лимфопоэза, а ключевая роль в развитии В-лимфоцитов принадлежит интрамедуллярным стромальным клеткам, которые коммитируют направление их развития, регулируют пролиферацию и дифференцировку [5, 6]. Естественно полагать, что изменение структуры и функции костномозговых стромальных регуляторов В-лимфопоэза может вести к нарушению

развития лимфоидных клеток-предшественниц, при этом не исключается их малигнизация.

Выживаемость больных ХЛЛ колеблется в широких пределах (от 2–3 лет до средней продолжительности жизни), что может свидетельствовать о гетерогенности патогенеза ХЛЛ [7–10]. Возможно, речь идет не только о различных формах одного заболевания, но и о существовании нескольких заболеваний в рамках ХЛЛ, которые формируются по разным патогенетическим механизмам, приводящим к одному последствию — накоплению долгоживущих лимфоцитов с определенным фенотипом. Что лежит в основе патогенеза, еще предстоит выяснить. Однако на основании известных фактов можно уверенно утверждать, что нишеобразующие элементы костного мозга и лимфоидных органов играют существенную роль в этом процессе.

**Цель настоящего исследования** — определить морфофункциональные особенности стромальных элементов кроветворного и лимфоидного микроокружения, участвующих в формировании ниши ГСК и лимфоидных клеток-предшественниц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили гистологические препараты костного мозга и лимфатических узлов 112 пациентов с ХЛЛ (64 мужчин, 48 женщин). Группу сочетанного анализа составили 45 пациентов. Трепанобиопсия костного мозга выполнена 96 больным, а биопсия лимфатических узлов — 61. Медиана возраста составила 60 лет. Всем пациентам был проведен полный набор диагностических исследований, определены стадии заболевания по Rai. Контрольную группу составило 50 человек: трепанобиопсия подвздошной кости выполнена 30 здоровым лицам, а биопсия лимфатических узлов — 20 участникам с реактивной лимфаденопатией (табл. 1). Пациенты контрольной группы были сопоставимы по полу, возрасту и расовой принадлежности с основной группой.

Для гистологического исследования использовались парафиновые блоки. При изучении гистологических структур применялись стандартные окраски: гематоксиллин и эозин, азур-П и эозин, импрегнация серебром,

**Таблица 2.** Маркеры, использованные при иммуноморфологическом исследовании

Маркер	Выявляемые структуры	Клон	Фирма-производитель
CD23	Дендритные клетки, В-клетки	SP23	Dako
CD21	Дендритные клетки, В-клетки	1F8	Dako
CD35	Дендритные клетки, В-клетки, гранулоциты, часть NK-клеток	Ber-Mac-DRC	Dako
FDC	Дендритные клетки	CNA.42	Dako
Фасцин	Дендритные клетки	55-K2	Dako
Ламинин	Ламинин	4C7	Dako
Десмин	Десмин	D33	Dako
Коллаген I типа	Коллаген I типа	COL-1	Abcam
Коллаген III типа	Коллаген III типа	Polyclonal	Abcam
Коллаген IV типа	Коллаген IV типа	CIV 22	Dako
CD34 Class II	Эндотелий, ранние миелоидные клетки	QBEnd 10	Dako
CD31	Эндотелий, гранулоциты, часть Т-клеток	JC70A	Dako
vWF	Эндотелий	Polyclonal	Dako
Ki-67	Маркер пролиферации	MIB-1	Dako
Zap70	Т-клетки, опухолевые клетки при ХЛЛ	2F3.2	Dako
CD146	Эндостальные, периваскулярные клетки	Polyclonal	Spring Bioscience

по Массону. Иммуногистохимический (ИГХ) анализ проводили с использованием панели первичных антител и полимерной системы визуализации Dako по протоколам окрашивания, рекомендованным производителем (табл. 2).

Морфометрическую оценку результатов выполняли на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 со встроенной фотокамерой с помощью программного обеспечения анализа изображений «ВидеоТест-Морфология 5.2», окуляр 10-кратного увеличения, объективы 20- и 40-кратного увеличения. Анализ гистологических препаратов проводился в 20 полях зрения для каждого образца.

Статистическая обработка полученных данных проводилась методом вариационной статистики с определением средней величины ( $M$ ), ее средней ошибки ( $m$ ), стандартного отклонения ( $SD$ ). Статистическая значимость различий оценивалась с помощью  $t$ -критерия Стьюдента, критерия Манна—Уитни. Различие между сравниваемыми показателями считалось статистически значимым при  $p \leq 0,05$ . Для выяснения зависимости между показателями применялся корреляционный анализ. Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ Statistica v.6.0, MedCalc, Microsoft Excel для Windows XP.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНОГО МОЗГА

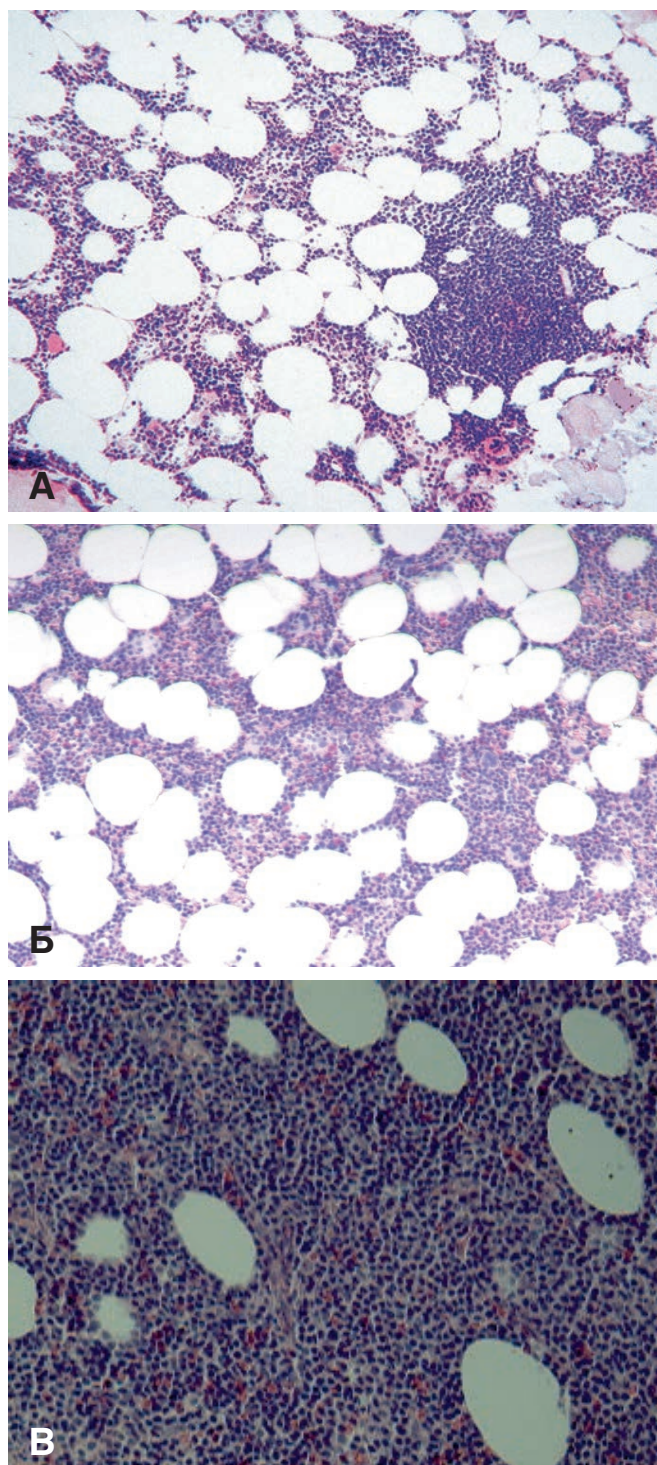
В костном мозге строма является структурной основой гемопоэзиндуцирующего микроокружения, она обеспечивает механическую опору клеткам, регулирует развитие ГСК, интрамедуллярную и трансэндотелиальную миграцию стволовых и зрелых клеток крови. Морфофункциональный анализ паренхиматозно-стромальных взаимосвязей показывает, что структурная организация стромальных элементов костного мозга направлена на поддержание динамического равновесия лимфопоэза и претерпевает значительные перестройки при ХЛЛ, свидетельствующие об их важной роли в патогенезе заболевания.

Известно, что опухолевое поражение костного мозга и характер инфильтрации кроветворной ткани опухолевыми клетками являются значимыми, т. к. эти факторы во многом определяют дальнейшее течение заболевания и его лечение. Полученные нами данные о типах опухолевой инфильтрации костного мозга при ХЛЛ не противоречат этому утверждению. При анализе 96 трепанобиоптатов мы выделили три типа инфильтрации костного мозга (рис. 1):

- 1) нодулярный (18,8 %,  $n = 18$ );
- 2) интерстициальный (27 %,  $n = 26$ );
- 3) диффузный (54,2 %,  $n = 52$ ).

Как было установлено, тип инфильтрации является одним из факторов оценки прогноза течения ХЛЛ [11].

При анализе стадий по Rai была показана тенденция к усилению инфильтрации костного мозга по мере увеличения стадии. Так, практически у всех пациентов с IV стадией заболевания (12 из 18) определялась диффузная инфильтрация костного мозга, а у 6 — интерстициальная. Таким образом, нодулярный характер инфильтрации при IV стадии ХЛЛ по Rai не встречался. Напротив, при I стадии заболевания у 15 пациентов отмечена нодулярная инфильтрация, у 7 — интерстициальная, диффузная инфильтрация выявлена лишь у 1 пациента (рис. 2).



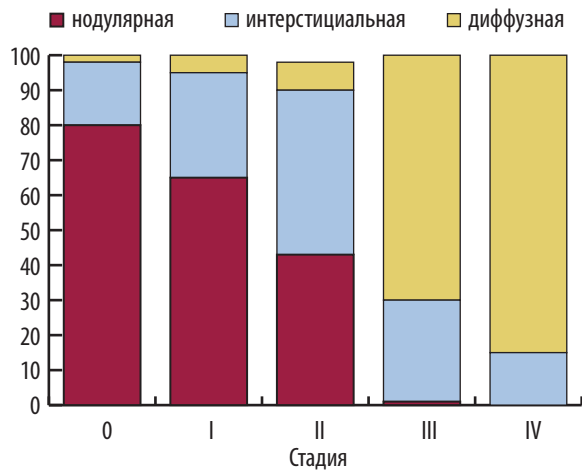
**Рис. 1.** Типы опухолевой инфильтрации в костном мозге при хроническом лимфолейкозе. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ :

А — нодулярный; Б — интерстициальный; В — диффузный

**Fig. 1.** Types of tumor infiltration in the bone marrow in chronic lymphocytic leukemia. Hematoxylin and eosin stain,  $\times 100$ :

A — nodular; Б — interstitial; В — diffuse

Мы провели гистоморфометрический анализ нишеобразующих структур микроокружения костного мозга: сосудов микроциркуляторного русла (МЦР), эндостальных клеток, белков внеклеточного и интраклеточного матрикса. Морфологические признаки реакции стромы костного мозга имелись при всех трех видах опухолевой инфильтрации костномозговой паренхимы. Однако они были выражены неравнозначно в целом и



**Рис. 2.** Распределение типов опухолевой инфильтрации костного мозга больных хроническим лимфолейкозом с учетом стадии по Rai

**Fig. 2.** Distribution of types of bone marrow tumor infiltration in patients with chronic lymphocytic leukemia taking into account the stage (according to Rai classification)

относительно нишеобразующих элементов стромального микроокружения в частности (табл. 3).

При выявлении в костномозговых пространствах губчатого вещества подвздошной кости нодулярных лимфоидных инфильтратов структурных перестроек элементов стромального микроокружения в кроветворной паренхиме вне зон инфильтрации не обнаружено. Морфология МЦР, а также клеточных элементов эндоста и костных балок на светооптическом уровне в гистологических препаратах, окрашенных рутинными методами, не изменялась, наблюдалось незначительное увеличение количества сосудов в пределах опухолевых инфильтратов. Что касается зон поражения, при импрегнации серебром можно было отметить наличие стромальной реакции на патологический процесс в форме увеличения количества ретикулиновых нитей в месте расположения нодулярных инфильтратов. При этом в некоторых случаях наблюдался очаговый ретикулиновый склероз.

Гистологические исследования стромальных структур микроокружения костного мозга при интерстициальном варианте опухолевой инфильтрации не выявили статистически значимых количественных перестроек нишеобразующих структур. Однако были заметны морфологические

изменения организации элементов микроокружения. Стромальная реакция заключалась в изменении ретикулинового каркаса паренхимы кроветворной ткани, в лакунах отчетливо определялось увеличение количества отдельно располагающихся фрагментов ретикулина. При этом в большинстве случаев ( $n = 14$ ) нити располагались изолированно и не образовывали пересечений или сетчатого рисунка. Это может свидетельствовать об изменении функциональной активности ретикулярных клеток. Увеличивается количество волокон коллагена III типа в субэндостальных пространствах. Статистически значимых количественных изменений клеток эндоста при данном поражении костного мозга не выявлено. Однако соотношение клеток с уплощенными и крупными ядрами изменяется в сторону повышения числа последних. Статистически значимо увеличена плотность сосудов по сравнению с нормальным костным мозгом (рис. 3).

Отчетливо проявлялись изменения стромального микроокружения костного мозга, включая структуры, образующие васкулярную и остеобластную ниши стволовых клеток при исследовании трепанобиоптатов с диффузным поражением костного мозга при ХЛЛ. Наряду с изменением количества и структуры нишеобразующих элементов происходили качественные перестройки стромального микроокружения в целом. Диффузная инфильтрация костного мозга сопровождалась редукцией адипоцитов, оставшиеся жировые клетки характеризовались снижением объема жировой вакуоли. В костномозговых пространствах происходило усиление ретикулинового рисунка вплоть до появления грубых ретикулиновых волокон, образующих пересечения с формированием ретикулинового склероза.

Мы определяли сосуды МЦР с использованием панели антител — специфичных маркеров клеток эндотелия: CD34 cI.II, CD31, фактор фон Виллебранда (vWF), характеризующих различную степень зрелости сосудов МЦР. ИГХ-исследования показали тенденцию к увеличению количества сосудов при диффузной инфильтрации по сравнению с контрольной группой. Для дальнейших сравнений мы выбрали средние значения удельной площади сосудов, полученные с антителами CD34. Этот маркер позволяет объективировать оценку МЦР различной степени зрелости, включая популяцию незрелых эндотелиальных клеток (табл. 4).

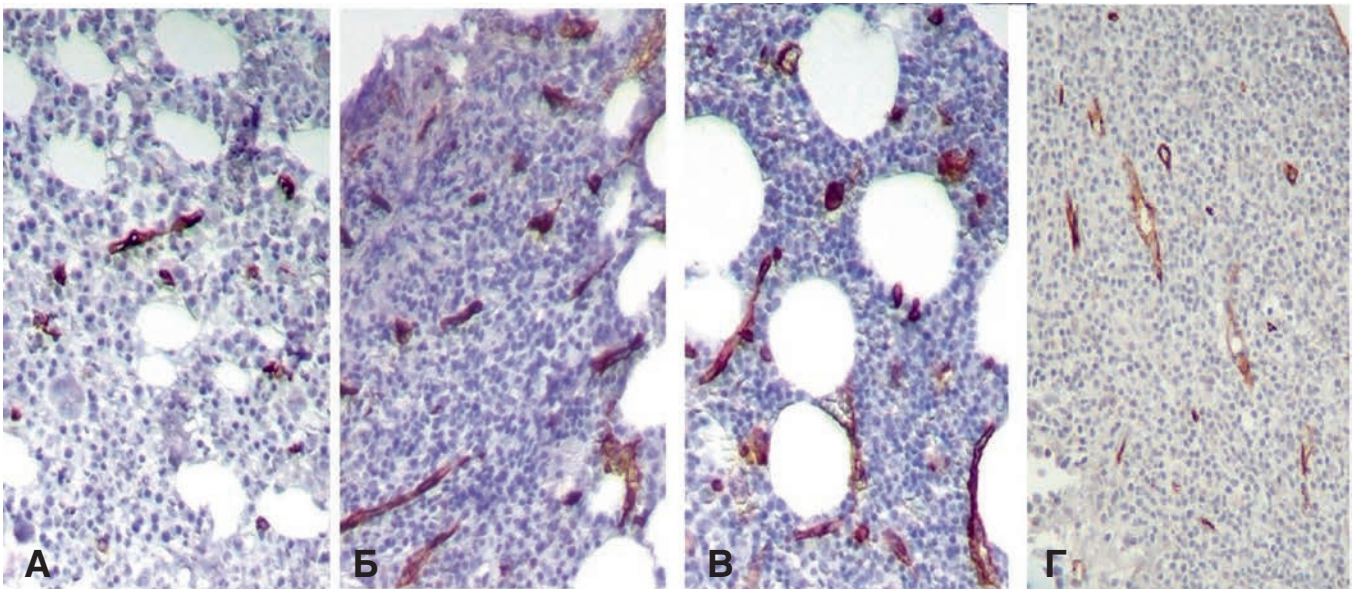
При сравнении удельной площади сосудов (CD34 cI.II) между нодулярной и интерстициальной инфильтра-

**Таблица 3.** Морфометрические показатели структур костного мозга подвздошной кости в зависимости от типа лимфоидной инфильтрации ( $M \pm m$ )

Паренхима и строма костного мозга	Больные ХЛЛ			Контроль, $n = 30$
	Тип опухолевой инфильтрации костного мозга			
	Нодулярная, $n = 18$	Интерстициальная, $n = 26$	Диффузная, $n = 52$	
Площадь гемопозитической ткани (в т. ч. лимфоидных пролифератов), %	52,3 ± 5,1 (15,7 ± 7,5)	57,2 ± 4,1 (25,0 ± 6,2)	70,7 ± 3,9* (51,15 ± 6,92)	51,2 ± 3,3
Площадь жировой ткани, %	27,5 ± 0,7	23,8 ± 3,8	13,0 ± 4,2*	28,1 ± 1,0
Площадь костной ткани, %	19,6 ± 4,4	18,3 ± 1,0	17,1 ± 1,3	21,0 ± 2,4
Площадь сосудов МЦР, %	12,3 ± 2,5	13,1 ± 1,2*	17,9 ± 3,7*	9,1 ± 1,2
Эндостальные клетки (количество на единицу площади)	1,3 ± 0,5	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,4*	1,4 ± 0,2
Пролиферативная активность Ki-67 в инфильтрате, %	2,3 ± 0,4	5,2 ± 0,7*	9,5 ± 1,6**	Не определяли

\*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

\*\*  $p < 0,05$  в сравнении с нодулярной инфильтрацией.



**Рис. 3.** Сосуды микроциркуляции в костном мозге при хроническом лимфолейкозе по данным иммуногистохимического исследования с использованием CD34 cl.II. Окраска ядер гематоксилином,  $\times 200$ :  
 А — контрольная группа; Б — нодулярная инфильтрация; В — интерстициальная инфильтрация; Г — диффузная инфильтрация

**Fig. 3.** Microcirculation vessels in the bone marrow in chronic lymphocytic leukemia, based on immunohistochemical test findings using CD34 cl.II. Hematoxylin stain of nuclei,  $\times 200$ :  
 А — control group; Б — nodular infiltration; В — interstitial infiltration; Г — diffuse infiltration

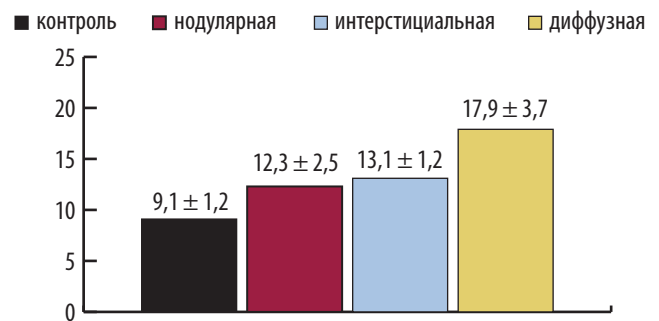
**Таблица 4.** Результаты определения удельной площади сосудов по результатам иммуногистохимических исследований с маркерами эндотелия ( $M \pm m$ )

Маркер эндотелия	Площадь, %			
	Нодулярная инфильтрация, $n = 18$	Интерстициальная инфильтрация, $n = 26$	Диффузная инфильтрация, $n = 52$	Контроль, $n = 30$
CD34 cl.II	$12,3 \pm 2,5$	$13,1 \pm 1,2^*$	$17,9 \pm 3,7^*$	$9,1 \pm 1,2$
CD31	$11,1 \pm 2,7$	$12,1 \pm 3,4$	$20,1 \pm 4,2^*$	$10,4 \pm 1,4$
vWF	$6,1 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,4^*$	$6,1 \pm 0,5$

\*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

цией значения статистически значимо не различались —  $12,3 \pm 2,5$  и  $13,1 \pm 1,2$  % соответственно. Выделить пороговое значение для этих типов инфильтрации не удалось. Однако тенденция к увеличению удельной площади сосудов прослеживалась при окраске со всеми антителами. При морфометрическом анализе были показаны статистически значимые различия между группой сравнения и пациентами с ХЛЛ. В контрольной группе площадь сосудов составила  $9,1 \pm 1,2$  %, при нодулярной инфильтрации —  $12,3 \pm 2,5$  %, при интерстициальной —  $13,1 \pm 1,2$  %, при диффузной —  $17,9 \pm 3,7$  % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 4). При этом во всех группах плотность сосудов была выражена в субэндостальных зонах и зонах лимфоидной инфильтрации костного мозга.

Наличие или отсутствие соматических мутаций в генах переменных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (IgHV) считается серьезным прогностическим показателем при ХЛЛ. Отсутствие мутации связывают с быстрым прогрессированием заболевания, в то время как гипермутации являются благоприятными для прогноза заболевания. Исследования профиля экспрессии генов при ХЛЛ показали, что существует корреляция между экспрессией 70-kd дзета-ассоциированного белка (Zap70) и статусом гипермутаций. До 97 % Zap70-положительных больных имеют немутантную конфигурацию гена IgHV, а 94 % Zap70-негативных — соматическую

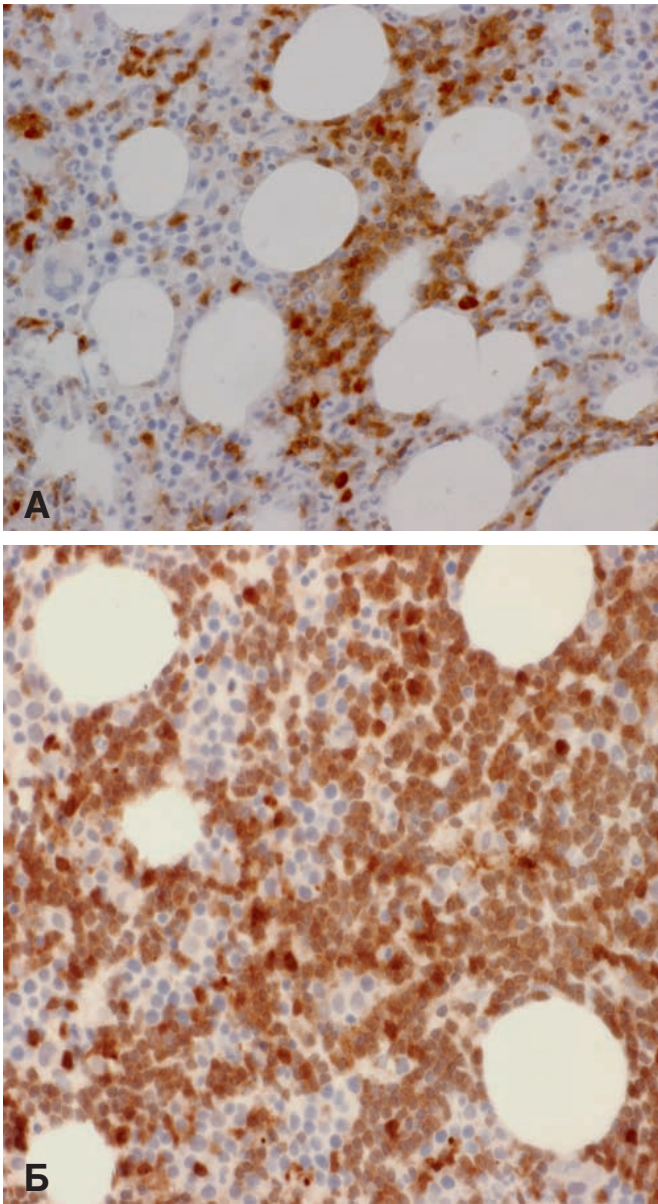


**Рис. 4.** Изменение удельной площади сосудов микроциркуляции (% от площади гемопоэтической ткани) в группах пациентов с различным типом опухолевой инфильтрации костного мозга (CD34 cl.II) в сравнении с контролем

**Fig. 4.** Changes in specific area of microcirculation vessels (% of the hematopoietic tissue area) in groups of patients with different types of bone marrow tumor infiltration (CD34 cl.II) as compared to the controls

гипермутацию. Такая отчетливая корреляция экспрессии с мутационным статусом IgHV наблюдается только при ХЛЛ. Таким образом, Zap70 может служить суррогатным маркером прогноза при ХЛЛ [12].

Мы выявили зависимость экспрессии белка Zap70 и типа инфильтрации костного мозга. Во всех случаях диффузной инфильтрации костного мозга ( $n = 52$ ) боль-

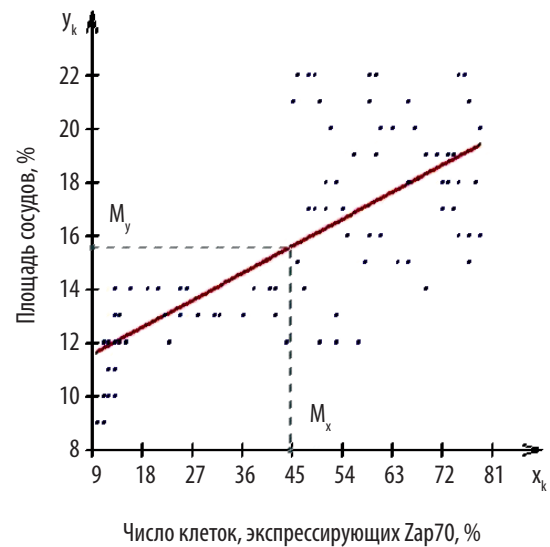


**Рис. 5.** Экспрессия Zap70 в опухолевых клетках, инфильтрирующих паренхиму костного мозга при хроническом лимфолейкозе. Окраска ядер гематоксилином,  $\times 200$ : А — умеренная экспрессия; Б — выраженная экспрессия

**Fig. 5.** Zap70 expression in tumor cells infiltrating bone marrow parenchyma in chronic lymphocytic leukemia. Hematoxylin stain of nuclei,  $\times 200$ : А — moderate expression; Б — marked expression

шинство лейкозных клеток было положительным (до 90 %) при исследовании на Zap70, в то время как при нодулярной инфильтрации экспрессии в подавляющем большинстве случаев (15 из 18) не обнаружено. В 4 наблюдениях экспрессия была выявлена только в 40 % клеток. Интерстициальная инфильтрация ( $n = 26$ ) костного мозга отличалась переменной экспрессией Zap70: у 9 больных — экспрессия лишь в 40 % клеток, у 12 — в 60 %, у 5 — отсутствие экспрессии Zap70 (рис. 5).

При анализе зависимости между площадью сосудов и экспрессией Zap70 выявлена четкая корреляция между этими показателями ( $n = 96$ ;  $R = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) (рис. 6). В немногочисленных работах по изучению площади сосудов в костном мозге при ХЛЛ получены противоречивые результаты. По данным некоторых исследователей, обилие сосудов является фактором плохого прогноза



**Рис. 6.** Зависимость уровня экспрессии Zap70 и площади сосудов микроциркуляции у больных хроническим лимфолейкозом. Наклонная линия показывает тренд исследуемых значений ( $n = 96$ ;  $R = 0,7$ ;  $p < 0,05$ )

**Fig. 6.** Dependence of the Zap70 expression level and microcirculation vessel area in patients with chronic lymphocytic leukemia. The slanting line demonstrates the trend in values under the test ( $n = 96$ ;  $R = 0.7$ ;  $p < 0.05$ )

и ассоциируется с дальнейшим прогрессированием и устойчивостью опухолевых клеток. Однако не все исследователи определяют роль этого фактора в развитии заболевания. Так, имеются работы, в которых не показано статистически значимое изменение площади сосудов, что может быть связано с недостаточной выборкой пациентов [13]. Следует подчеркнуть, что мы определили площадь сосудов с применением панели антител, а также с одновременным анализом экспрессии прогностического маркера Zap70. В результате были получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что площадь сосудов МЦР изменяется в зависимости от стадии, характера инфильтрации костного мозга и может служить прогностическим маркером развития ХЛЛ [11].

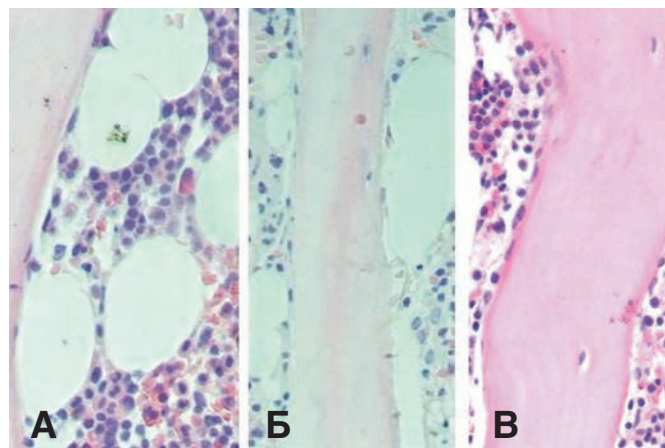
Были также проанализированы данные миелограммы и периферической крови пациентов с одновременной оценкой характера поражения костного мозга на материале трепанобиоптатов. Соотношение между типами лимфоидной инфильтрации в костном мозге и параметрами периферической крови и миелограммы представлено в табл. 5. Изменения показателей выявлялись при всех типах поражения, однако в наибольшей — при диффузном. В крови отмечалось более высокое содержание лейкоцитов ( $114,9 \pm 28,2 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфоцитов ( $101,8 \pm 13,2 \times 10^9/\text{л}$ ), снижение уровня гемоглобина ( $87 \pm 5,7 \text{ г/л}$ ), а в миелограмме увеличено содержание лимфоцитов ( $82,1 \pm 3,3 \%$ ) и миелокариоцитов ( $460,3 \pm 131,2 \times 10^9/\text{л}$ ).

Таким образом, учитывая, что анемия и лимфоцитоз являются неблагоприятными прогностическими факторами заболевания, можно заключить, что нодулярный и интерстициальный типы инфильтрации костного мозга свидетельствуют о более благоприятном течении ХЛЛ в сравнении с диффузным типом его поражения.

Эндостальная выстилка образована остеобластами, остеогенными клетками-предшественницами (часто обозначаемыми как клетки костной выстилки — bone-

**Таблица 5.** Соотношение между типами лимфоидной инфильтрации костного мозга и гематологическими показателями гемо- и миелограммы при хроническом лимфолейкозе

Тип инфильтрации костного мозга	Периферическая кровь			Миелограмма		
	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты, %	Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты, %	Миелокарициты, $\times 10^9/\text{л}$
Диффузная	87 $\pm$ 5,7*	114,9 $\pm$ 28,2*	88,6 $\pm$ 2,6*	101,8 $\pm$ 13,2*	82,1 $\pm$ 3,3*	460,3 $\pm$ 131,2*
Интерстициальная	112 $\pm$ 11,2	31,7 $\pm$ 6,8*	85,2 $\pm$ 2,5*	27,1 $\pm$ 8,3*	62,9 $\pm$ 5,4*	278,8 $\pm$ 100,8*
Нодулярная	120 $\pm$ 8,7	9,1 $\pm$ 4,9	60,5 $\pm$ 12,5	5,5 $\pm$ 1,6	36,2 $\pm$ 13,2	143,2 $\pm$ 18,2

\*  $p < 0,05$  в сравнении с нодулярной инфильтрацией.**Рис. 7.** Эндостальные клетки в костном мозге. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ :

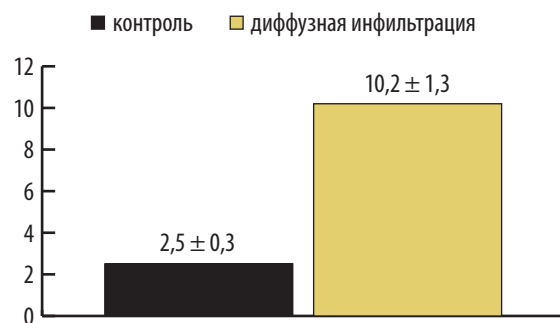
А — контрольная группа; Б — интерстициальная инфильтрация; В — диффузная инфильтрация

**Fig. 7.** Endosteal cells in bone marrow. Hematoxylin and eosin stain,  $\times 400$ :

А — control; Б — interstitial infiltration; В — diffuse infiltration

lining cells) и остеокластами. При этом остеобласты рассматриваются как главный клеточный компонент эндоста, отвечающий за регуляцию ГСК [14, 15]. Анализ количества эндостальных клеток показал статистически значимые различия между группой с диффузной инфильтрацией костного мозга и контролем —  $2,3 \pm 0,4$  и  $1,4 \pm 0,2$  клетки на единицу измерения соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Статистически значимых отличий между контрольной группой ( $1,4 \pm 0,2$ ) и группами с нодулярной ( $1,3 \pm 0,5$ ) и интерстициальной ( $1,8 \pm 0,4$ ) инфильтрацией не получено ( $p \geq 0,05$ ) (рис. 7).

Антиген CD146 (МСАМ) первоначально был идентифицирован как онкомаркер меланомы. Однако в последних работах показано, что CD146 участвует в различных физиологических процессах, таких как сигнальная трансдукция, миграция клеток, дифференцировка мезенхимных клеток и ангиогенез. В основном CD146+ в костном мозге — это субэндотелиальные клетки, которые принимают участие в регуляции ангиогенеза. В исследованиях было показано, что во многих органах определяется экспрессия CD146 на периваскулярных клетках, в основном на перицитах. CD146/МСАМ-позитивные клетки являются важной составляющей ниши ГСК. Роль стромальных элементов CD146+ заключается в том, что они экспрессируют CXCL12 и другие продукты экспрессии генов, причастных к регулированию ГСК. Показано, что клетки CD146+ поддерживают долгосрочное нахождение ГСК в нише через клеточные контакты и, по крайней мере частично, посредством активации сигнального пути Notch [16]. В наших исследованиях количество клеток с

**Рис. 8.** Клетки CD146+ в эндостальной зоне костного мозга (% от площади гемопоэтической ткани)**Fig. 8.** CD146+ cells in the endosteal zone of bone marrow (% of the hematopoietic tissue area)

экспрессией CD146 было увеличено при диффузном типе поражения костного мозга по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Экспрессия CD146 наблюдалась не только на клетках эндоста, но и в субэндостальных зонах (рис. 8).

Характерной чертой ХЛЛ является накопление в организме иммунологически дефектных долгоживущих лимфоцитов [3, 7]. В исследованиях *in vitro* было показано, что длительность жизни лейкозных клеток определяется адгезивными взаимодействиями с кроветворным микроокружением, в результате которых блокируется клеточный апоптоз. Адгезия осуществляется посредством адгезивно-рецепторных молекул клеточных мембран и компонентов внеклеточного матрикса, участвующих в проведении внутриклеточных регуляторных сигналов, выраженность которых регулируется цитокинами. Изменение продукции цитокинов стромальными клетками через воздействие на рецепторный аппарат клеточных мембран может приводить к нарушению механизма регуляции клеточного цикла, удлинению срока жизни лимфоцитов и их дифференцировки. При импрегнации серебром у больных ХЛЛ наблюдалось повышение числа ретикулярных клеток в интрамедуллярных пространствах и развитие очагов фиброза, что также определяется, как правило, при диффузном типе поражения костного мозга. При гистологических и ИГХ-исследованиях отмечалась тенденция к перераспределению коллагена I, III и IV типов. Эти изменения могут быть причиной нарушения секреции и соотношения гуморальных факторов регуляции лимфопоэза и, как следствие, приводить к изменению пролиферации и дифференцировки стволовых клеток.

Коллагены — важные структурные белки внеклеточного матрикса. Содержание коллагена в костном мозге определяется его контролируемой продукцией и гибелью популяций коллагенпродуцирующих клеток, таких как фибробласты и эндотелиальные клетки. Фибробласты



продуцируют коллаген I и III типов, в то время как эндотелиальные клетки — коллаген IV типа. Между этими клетками есть различие и в топографической ориентации. Так, фибробласты окружают костномозговые синусы и чередуются с гемопоэтическими клетками в костномозговой паренхиме, а эндотелиальные клетки образуют стенки сосудов МЦР. Накопление коллагена в костном мозге может быть обусловлено усилением синтеза, нарушением деградации коллагена или обоими механизмами одновременно. В то же время усиление синтеза коллагена может быть связано не только с повышенным уровнем его продукции клетками, но и с увеличением количества этих клеток [15, 17, 18]. Мы обнаружили изменения в распределении коллагена разных типов по мере нарастания фиброзной патологии. Так, была показана тенденция к увеличению количества коллагена I и III типов, в то время как коллаген IV типа и ламинин практически не выявлялись, сосуды имели прерывистую базальную мембрану. Коллаген I типа в костном мозге во всех случаях обнаруживается в трабекулах, рядом со стромальными клетками. Коллаген III типа определяется в зонах эндоста, рядом с мегакариоцитами.

Представленные результаты изучения состояния стромы костного мозга больных ХЛЛ свидетельствуют о реакции стромального микроокружения на появление опухолевых клеток в интрамедуллярных пространствах губчатого вещества кости. Как мы отмечали ранее, именно в костной ткани присутствует специализированная популяция клеток стромы, формирующая нишу для предшественниц лимфопоэза. Указанная категория определяет, в частности, развитие стволовых клеток в направлении В-лимфопоэза. Ключевыми структурными компонентами, формирующими нишу, являются эндостальные стромальные клетки губчатого вещества кости. Они совместно с нарабатываемыми ими гуморальными регуляторными факторами и внеклеточным матриксом при участии микрососудов обеспечивают реализацию генетической программы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, в т. ч. лимфоидных предшественников. Из последних может возникнуть пул неопластических клеток при ХЛЛ [19–21]. Как следует из наших исследований, отчетливые изменения регистрировались именно в эндостальных зонах. В них происходит перестройка соотношения эндостальных клеток и системы микроциркуляции. Это обстоятельство может служить весомым аргументом, указывающим на возможность перестройки функционального потенциала гемопоэтической ниши. К настоящему времени твердо установлено значение дефектов ниши в нарушениях лимфопоэза, вплоть до непосредственного участия стромальных элементов, формирующих нишу, в появлении лейкозного клона [22–25]. На наш взгляд, вероятность важной, если не ключевой, роли в патогенезе ХЛЛ дефектов стромального микроокружения 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 клеток.

Таким образом, отмеченные морфологические особенности стромы костного мозга больных ХЛЛ могут быть обусловлены как первичным поражением кроветворного микроокружения, так и цитокиновым дисбалансом в результате воздействия на строму лейкозного клона. Полученные результаты относительно дефектов стромы при разных типах инфильтрации могут свидетельствовать как о биологической гетерогенности заболевания, так и о постепенном развитии опухолевого процесса. Взаимоотношение строма—паренхима в системе лимфопоэза является базисным для развития и созревания миелоидных и лимфоидных клеток в норме. На основании полученных нами данных можно говорить о роли дефектов стромальных нишеобразующих структур в прогрессии ХЛЛ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

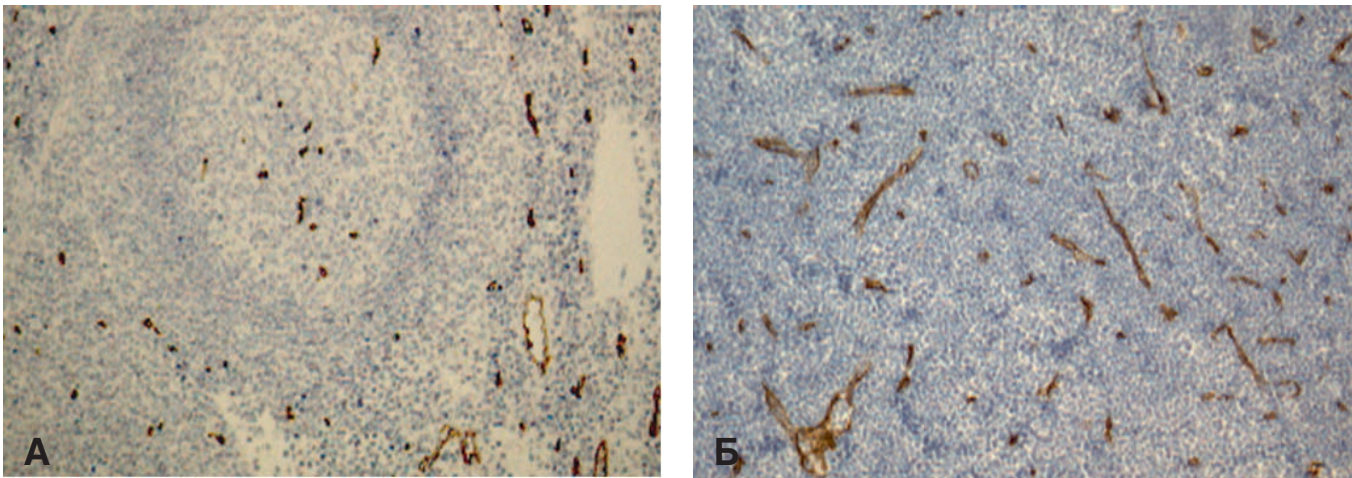
Другая часть наших исследований была посвящена оценке паренхиматозно-стромальных особенностей лимфатических узлов при ХЛЛ. По данным литературы, такой анализ не проводился. Настоящее исследование было направлено на анализ нишеобразующих элементов стромы — дендритных клеток и сосудов МЦР.

В функциональном отношении клетки лимфоидной системы могут быть разделены на три типа: стволовые кроветворные клетки, клетки-предшественницы первичных лимфоидных органов, клетки вторичных лимфоидных органов. По темпам клеточного обновления лимфоидная ткань занимает одно из первых мест. Развитие лимфоидных клеток не прекращается на протяжении всей жизни. Это необходимо для приспособления иммунитета к постоянно изменяющейся иммунологической ситуации. Основная функция лимфатических узлов состоит в обеспечении взаимодействия антигена, который поступает туда по афферентным лимфатическим сосудам, с Т- и В-лимфоцитами, мигрирующими из крови [26, 27].

В лимфатических узлах можно выделить строму с фиксированными клетками и паренхиму с клеточной популяцией, которая претерпевает изменения. Фибробластические ретикулярные клетки составляют основную стромальную популяцию и формируют ретикулярную сеть. Ретикулярная сеть выполняет несколько функций: формирование структуры лимфатического узла и обеспечение условий для пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, а также передачи сигналов между клетками. Коллаген I и III типов отвечает за прочность ретикулярной сети, коллаген IV типа и ламинин маркируют сосудистую систему лимфатического узла.

При морфологическом исследовании биоптатов лимфатических узлов у больных ХЛЛ во всех случаях отмечалось нарушение гистоархитектоники компонентов лимфоидной ткани. Диффузная инфильтрация лимфоцитами наблюдалась у всех больных. В 18 наблюдениях определялся так называемый псевдофолликулярный тип роста — участки опухолевых разрастаний, окрашивающиеся в более светлые тона на более интенсивно выраженном фоне.

В подавляющем большинстве случаев в ткани лимфатических узлов имел место диффузный рост лимфоцитов малых размеров с узким ободком цитоплазмы, наличием ядер округлой формы, глыбчатой структурой хроматина. Ядрышки либо не выявлялись, либо слабо



**Рис. 9.** Выявление сосудов иммуногистохимическим методом с антителами CD34 cl.II,  $\times 100$ :

А — лимфатический узел в контрольной группе; Б — лимфатический узел при хроническом лимфолейкозе, сосуды микроциркуляторного русла

**Fig. 9.** Detection of cells by the immunohistochemical test with CD34 cl.II antibodies,  $\times 100$ :

А — lymph node in the controls; Б — lymph node in chronic lymphocytic leukemia, microcirculatory bed vessels

контуривали. Наряду с малыми лимфоцитами встречались клетки средних размеров — пролимфоциты с более обильной цитоплазмой, просветленными ядрами, в которых определялись ядрышки. Наконец, в опухолевых инфильтратах обнаруживались крупные клетки с большими везикулярными ядрами, в которых центрально располагались круглые ядрышки — параиммунобласты. В большинстве случаев ХЛЛ опухолевый инфильтрат выглядел однородным, но в части наблюдений выделялись пролиферативные зоны роста — псевдофолликулы. Клетки псевдофолликулов наряду с малыми лимфоцитами включали в себя параиммунобласты и пролимфоциты; эти зоны также богаты клетками, экспрессирующими маркер пролиферации Ki-67.

Импregnация серебром гистологических препаратов лимфатических узлов показала деструктивные изменения ретикулиновой сети лимфоидной ткани. Это происходило в двух противоположных направлениях: дезорганизация ретикулиновых волокон с уменьшением их количества относительно площади лимфоидной ткани ( $n = 47$ ; 77 %) и образование более грубой сети с очагами ретикулинового склероза ( $n = 14$ ; 23 %).

При гистоморфологическом исследовании кровеносные сосуды были представлены сосудами МЦР, крупными сосудами, венулами с высоким эндотелием. ИГХ-исследование сосудов проводилось с использованием моноклональных антител Dako CD34 cl.II, CD31, vWF, анти-ламинин, анти-коллаген IV типа. Исследования показали, что на фоне инфильтрации лимфатических узлов зрелыми лимфоцитами обнаруживалось увеличение количества мелких сосудов, а также сосудов с выбухающими в просвет эндотелиоцитами с крупными ядрами, хорошо очерченными ядрышками и фибробластоподобными клетками по периферии сосудов (рис. 9). Структура эндотелиоцитов указанных сосудов была характерна для клеток с высокой функциональной активностью. Морфометрический анализ сосудов показал статистически значимое увеличение площади сосудов при ХЛЛ:  $12,8 \pm 0,3$  % по сравнению с  $6,5 \pm 0,5$  % в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ). ИГХ-исследование с антителами к ламинину и коллагену IV типа выявило прерывистую или

**Таблица 6.** Результаты определения плотности сосудов в лимфатических узлах ( $M \pm m$ )

Маркер эндотелия	Площадь, %	
	Больные ХЛЛ, $n = 61$	Контроль, $n = 20$
CD34 cl.II	$12,8 \pm 0,3^*$	$6,5 \pm 0,5$
CD31	$18,3 \pm 0,7^*$	$10,0 \pm 0,8$
vWF	$15,0 \pm 0,3^*$	$8,0 \pm 0,2$

\*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

отсутствующую базальную мембрану в большинстве сосудов (табл. 6).

Ультрaструктурные исследования стромы лимфатических узлов показали, что число микрососудов у пациентов с лимфаденопатией было обычно низким и значительно возрастало при В-клеточных неходжкинских лимфомах. При опухолях промежуточной степени злокачественности зарегистрировано значительное повышение числа микрососудов, а самое большое их содержание наблюдалось при лимфомах высокой степени злокачественности [28]. Эти данные подтверждают мнение, что ангиогенез усиливается с ростом степени злокачественности, и подчеркивают его роль как эпигеномного фактора при прогрессировании.

Формирование сосудов в опухолях происходит на фоне изменений внеклеточного матрикса. Это приводит к развитию неполноценных сосудов преимущественно капиллярного типа, имеющих нередко прерывистую базальную мембрану и нарушенную эндотелиальную выстилку. Эндотелий может замещаться опухолевыми клетками, а иногда и вовсе отсутствовать. В лимфатических узлах при ХЛЛ мы выявили увеличение количества мелких сосудов на фоне сниженной экспрессии белков внеклеточного матрикса — коллагена IV типа, ламинина и десмина.

Для многих опухолей показана связь плотности микрососудов с прогрессией заболевания. Недавно была установлена зависимость показателей выживаемости при ХЛЛ от сывороточного уровня факторов ангиогенеза — эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF)

и фактора роста фибробластов (bFGF) [7]. Одной из причин повышенного интереса к механизмам ангиогенеза было наличие некоторых нарушений данного процесса в отличие от нормального физиологического. Особенности строения кровеносных сосудов на разных стадиях их формирования определяются уровнем экспрессии и характером взаимодействия различных ангиогенных факторов. В результате реализации аутокринных и паракринных механизмов регуляции уровня ангиогенных факторов, секретируемых эндотелиальными клетками и клетками внеклеточного матрикса, происходит формирование локальных очагов васкуляризации. В них наблюдается активное прорастание ткани кровеносными капиллярами как в норме, так и при патологии.

В качестве регуляторов ангиогенеза могут выступать белковые соединения, продуцируемые различными клетками: лимфоцитами, макрофагами, тучными клетками, эндотелиальными, опухолевыми и др. Известно, что ангиогенез в опухоли происходит в условиях нарушенных межклеточных и паренхиматозно-стромальных взаимоотношений. Наряду с факторами роста в процессе ангиогенеза имеет большое значение состав внеклеточного матрикса стромы опухоли [29].

Белки внеклеточного матрикса, такие как коллаген I и III типов, ламинин, десмин, практически не определяются при ХЛЛ. В то же время экспрессия их в контрольной группе выявляется рядом с сосудистым компонентом в воротах лимфатических узлов, под капсулой и в Т-зависимой зоне.

Ключевая роль развития лимфоидных предшественников в лимфатических узлах принадлежит дендритным ретикулярным клеткам. Исследования последних лет показали изменения количества дендритных ретикулярных клеток при разных ИГХ-вариантах лимфом. Так, при лимфомах с фолликулярным характером роста наблюдается увеличение количества ретикулярных клеток, в то время как при диффузном — снижение их числа и значительные деструктивные изменения. Данные о вовлечении в патологический процесс дендритных ретикулярных клеток при неходжкинских лимфомах были подтверждены при ИГХ- и экспериментальных исследованиях [30]. Работы, посвященные изучению дендритных клеток при некоторых формах опухолей, показали, что количество и иммунофенотип этих клеток, их распределение в опухо-

левой и неопухоловой ткани отражаются на прогнозе этих новообразований [31, 32].

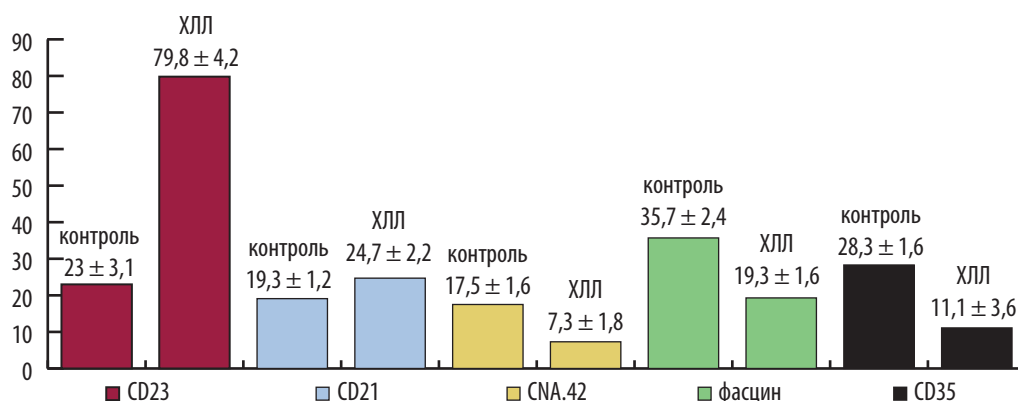
Мы выявили дезинтеграцию сети фолликулярных дендритных клеток (ФДК) лимфатических узлов. При ИГХ-исследовании с панелью антител получены интересные данные. Так, не было отмечено выраженной экспрессии маркера дендритных клеток FDC CNA.42, антигены CD23 и CD21 выявлялись на опухолевых клетках, маркер CD35 также определялся в небольшом числе наблюдений и в небольшом процентном соотношении. Фасцин, маркирующий интердигитирующие и фолликулярные дендритные клетки, присутствовал в меньшем объеме в сравнении с контролем (табл. 7, рис. 10 и 11).

Эти данные свидетельствуют о дезинтеграции сети ФДК в лимфатических узлах, косвенно указывают на сокращение их числа под действием опухолевого клона и, вероятно, судя по отсутствию экспрессии ряда маркеров, на смену их фенотипа. Исследования ФДК показали гетерогенность их клеточной популяции. Так, ФДК из светлой зоны герминативного центра и темной зоны имеют разные поверхностные маркеры. Так, экспрессия DRC-1 и CD23 характерна для клеток из светлой зоны вторичного лимфатического фолликула. ФДК считаются наиболее важным фактором, определяющим состав лимфоидной

**Таблица 7.** Экспрессия маркеров нишеобразующих структур лимфатических узлов (M ± m)

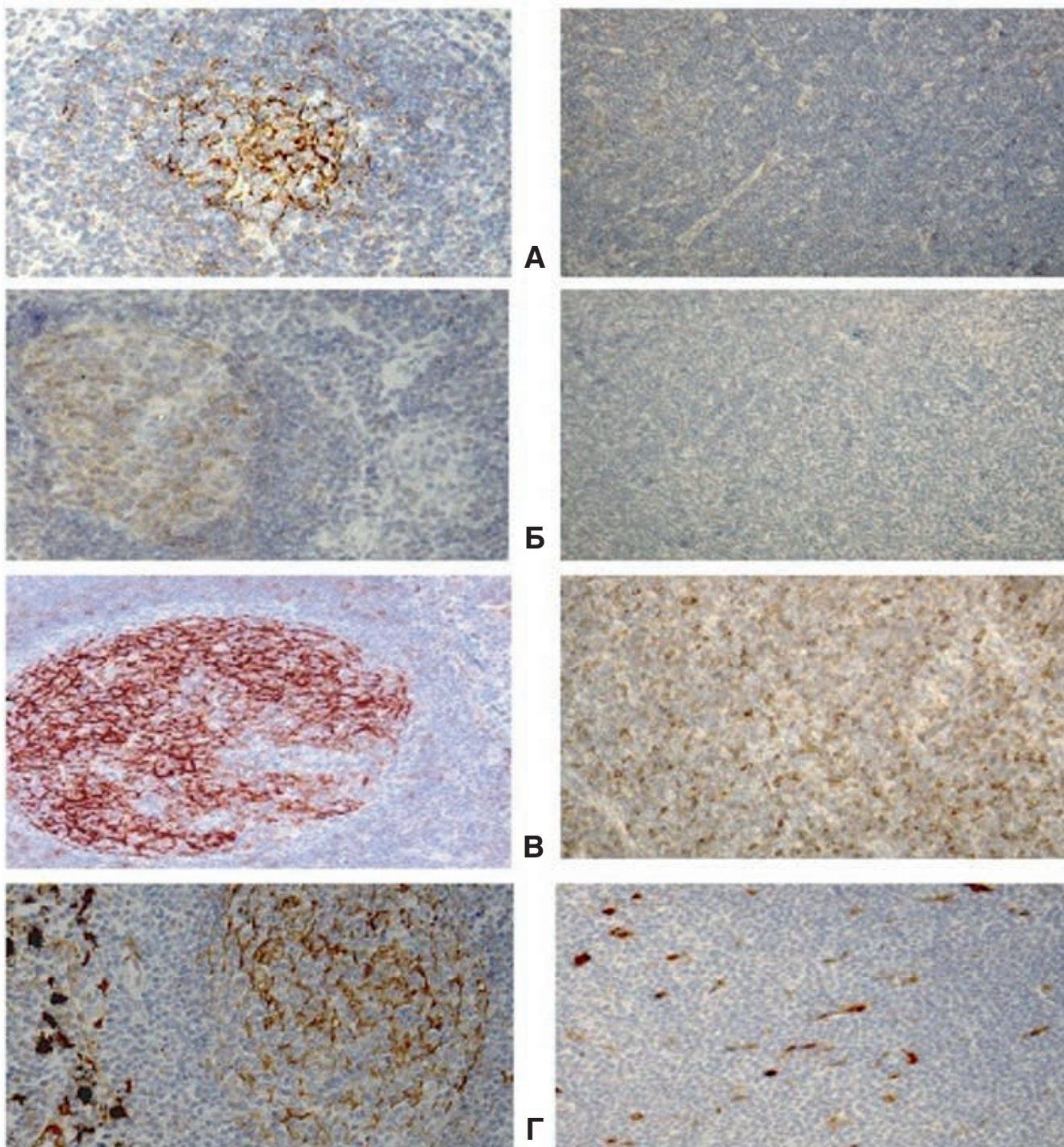
Маркер	Нишеобразующие структуры, % от площади лимфатического узла	
	Больные ХЛЛ, n = 61	Контроль (лимфаденопатии), n = 20
Сосуды CD34 cl.II	12,8 ± 0,3*	6,5 ± 0,5
CD23	79,8 ± 4,2*	23,0 ± 3,1
CD21	24,7 ± 2,2 (n = 42)	19,3 ± 1,2
CNA.42	7,3 ± 1,8*	17,5 ± 1,6
Фасцин	19,3 ± 1,6*	35,7 ± 2,4
CD35	11,1 ± 3,6*	28,3 ± 2,3
Zap70	72,4 ± 8,2 (n = 35)* 24,3 ± 2,7 (n = 26)	18,2 ± 2,1 (Т-клетки)
Коллаген IV типа	9,5 ± 2,1*	5,1 ± 0,3
Коллаген III типа	2,7 ± 0,8	3,1 ± 0,5
Ламинин	1,5 ± 0,3*	3,2 ± 0,4
Десмин	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2

\* p < 0,05 в сравнении с контролем.



**Рис. 10.** Иммуногистохимическое определение фолликулярных дендритных клеток с использованием широкой панели антител (% от площади лимфатического узла) ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

**Fig. 10.** Immunohistochemical analysis of follicular dendritic cells using a wide antibody panel (% of the lymph node area) ХЛЛ — chronic lymphocytic leukemia.



**Рис. 11.** Лимфатические узлы контрольной группы (левый столбец) и пациентов с хроническим лимфолейкозом (правый столбец). Выявление фолликулярных дендритных клеток с помощью антител к CD35 (А), CNA.42 (Б), CD23 (В), фасцину (Г). Иммуногистохимическое исследование,  $\times 200$

**Fig. 11.** Lymph nodes in the controls (left column) and in patients with chronic lymphocytic leukemia (right column). Detection of follicular dendritic cells using antibodies against CD35 (A), CNA.42 (B), CD23 (B), and fascin (Г). Immunohistochemical test,  $\times 200$

популяции и влияющим на регулирование функциональной активности лимфоидных клеток. Они могут создавать не только противоопухолевые, но и проопухолевые стимулы. Дендритные клетки совместно с трансформирующим фактором роста  $\beta$  способствуют дифференцировке предшественников FоxP3-клеток в зрелые FоxP3-клетки CD4+. С другой стороны, они не только презентуют опухолевые антигены NK- и цитотоксическим клеткам, которые обеспечивают противоопухолевый иммунитет, но и принимают непосредственное участие в элиминации опухолевых клеток [32, 33].

Известно, что ХЛЛ характеризуется накоплением долгоживущих клеток CD5+, устойчивых к апоптозу [6, 34]. Несмотря на их долгую жизнь *in vivo*, клетки ХЛЛ часто уходят в апоптоз в условиях *in vitro*. Клетки не получают сигналов выживания, которые присутствуют в микроокружении *in vivo*. Сокращение числа ФДК в лимфатических узлах больных ХЛЛ и изменения в их фенотипе, что показано в наших исследованиях, могут служить предиктором выживания и прогрессии лейкозного клона. Возможно, опухолевые клетки создают условия для подавления системы ФДК на уровне цитокинов.

С другой стороны, при некоторых вариантах лимфом показано увеличение количества дендритных клеток как в опухолевых инфильтратах, так и в непораженных участках лимфатических узлов. Исследователи предполагают, что дендритные клетки совместно с другими компонентами стромы лимфатических узлов могут изменять свою морфологию, выполняемые функции и обеспечивать поддержание лейкозного клона, создавая условия для пролиферации клеток и быстрого роста опухолевой массы [6]. Вполне допустима мысль, что сокращения числа ФДК на самом деле не происходит, однако поверхностный аппарат клеток изменяется и они приобретают мутантный фенотип.

Биологическое значение этого факта еще предстоит выяснить, но уже сейчас очевидна вовлеченность дендритных клеток в генез неопластической трансформации лимфоидных предшественников и их роль в поддержании лейкозного клона.

Таким образом, выяснение характера воздействия стромы на гемопоэз остается актуальной задачей для гематологии. Для решения проблемы регуляторных воздействий целесообразно использовать морфологические методы, включая ИГХ. Факты, полученные с применением морфологических методов при изучении костного мозга и лимфоидной ткани в норме и при нарушениях кроветворения, способствуют дальнейшей конкретизации роли отдельных компонентов кроветворной и лимфоидной стромы в нормальном и малигнизированном гемопоэзе. Злокачественная трансформация ГСК достигается при наличии нескольких условий. Основными принято считать следующие: генетические изменения в клетке, невозможность уйти в апоптоз, а также благоприятное микроокружение для развития и прогрессии опухолевого клона. Имеется большое количество фактов, свидетельствующих о различных нарушениях при малигнизации ГСК и их коммитированных в различных направлениях потомков. Они включают в себя молекулярно-генетические и клеточные механизмы. Давно изучается роль экспрессии онкогенов, гуморальных ингибиторов и стимуляторов пролиферации, цитокинов, факторов апоптоза и ангиогенеза, дисфункции иммунной системы и других процессов. Однако в последние годы стали проводиться исследования, посвященные роли гемопоэтической ниши в злокачественной трансформации ГСК [15, 19, 35–40].

Полученные нами результаты подтверждают существующее положение о роли дефектов ниши в злокачественной трансформации ГСК и отражают некоторые особенности патогенеза ХЛЛ. В частности, они дают представление о морфофункциональных перестройках стромальных нишеобразующих элементов костного мозга и лимфатических узлов, имеющих существенное значение в процессе малигнизации лимфоидных клеток-предшественниц при этом заболевании.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, в постнатальный период формирующая гемопоэтическую нишу эндостальная зона является основным местом локализации стволовых кроветворных клеток. Здесь же определяется их дифференцировка в лимфоидном направлении, продвижение от эндоста в экстравазальных пространствах к синусоидам и далее в лимфоидную ткань [15, 35, 38, 41, 42]. Регуляторный эффект стромальной ниши осуществляется путем

прямых контактов стромальных клеток с кроветворными предшественниками, а также посредством нарабатываемых стромой гуморальных факторов стимуляции и ингибирования процессов пролиферации и дифференцировки ГСК. Контроль над формированием рецепторного аппарата лимфоцитов и их спецификации лежит в основном на клетках стромального микроокружения костного мозга и тех лимфоидных органов и тканей, куда попадают лимфоциты. Любые нарушения клеток микроокружения могут приводить к абберациям функционального статуса лимфоидных клеток, в частности их рецепторного аппарата. *In vitro* было показано, что развитие В-лимфоцитов в условиях нормального лимфопоэза определяется их адгезивным взаимодействием со стромой [43]. У больных ХЛЛ эти взаимодействия нарушены из-за неполноценности адгезивных молекул и нарушения продукции стромой гуморальных факторов, определяющих продолжительность жизни лимфоцитов при ХЛЛ. Изменения структурной организации и функции клеток кроветворного микроокружения могут стать одной из причин нарушения механизмов регуляции нормального В-лимфопоэза, приводящих к развитию заболевания [44].

В-лимфопоэз не ограничивается только костным мозгом, в нем происходит вертикальная дифференцировка В-лимфоцита в результате которой образуется наивная В-клетка. Дальнейшее созревание В-лимфоцитов имеет место в лимфатических узлах, герминативном центре вторичного лимфатического фолликула под воздействием антигена, который является для В-лимфоцитов основным фактором роста и дифференцировки. Здесь огромное значение имеет состояние микроокружения, основными составляющими которого являются дендритные клетки, ретикулярные клетки, внеклеточный матрикс и образующиеся в строме цитокины. При условии попадания наивного В-лимфоцита в измененное микроокружение вероятность развития опухоли и дисбаланса пролиферации/апоптоза увеличивается многократно.

Деструкция стромальной архитектоники нишеобразующих структур костного мозга и лимфатических узлов может быть ключевым фактором становления и развития ХЛЛ [11, 20, 27, 43]. В условиях малигнизации миелоидных и лимфоидных предшественников характер перестроек нишеобразующих структур костного мозга и лимфоидной ткани имеет важное значение для установления причин развития системных заболеваний крови, определения тактики лечения, оценки его эффективности и прогноза [45–50].

Необходимо отметить, что учение о роли ниши в нормальном и малигнизированном гемопоэзе только начинает разрабатываться. Эта проблема волнует умы многих ученых, и объем накопленных разрозненных данных о роли микроокружения достиг того предела, когда приходит осознание, что в кроветворной ткани взаимодействие стромы — паренхимы имеет основополагающее значение для развития ГСК. В решении этой проблемы сочетанный морфологический, иммуноморфологический, молекулярно-генетический анализ нишеобразующих структур стромального микроокружения необходим для обнаружения причинно-следственных связей, определяющих развитие и прогрессию многих опухолей системы крови, а также для поиска новых мишеней терапии этих заболеваний.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Н.Ю. Семенова, В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев.

**Сбор и обработка данных:** Н.Ю. Семенова.

**Предоставление материалов исследования:** В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев.

**Анализ и интерпретация данных:** Н.Ю. Семенова, В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев.

**Подготовка рукописи:** Н.Ю. Семенова, В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев.

**Окончательное одобрение рукописи:** В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев.

**Административная поддержка:** С.С. Бессмельцев.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ругаль В.И. Морфофункциональная характеристика стромы костного мозга в норме и при остром миелобластном лейкозе: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Л., 1989.  
[Rugal' VI. Morfofunkcionalnaja harakteristika stromy kostnogo mozga v norme i pri ostrom mieloblastnom lejkoze. (Morphofunctional characteristics of the bone marrow stroma in normal persons and in patients with acute myeloblastic leukemia.) [dissertation] Leningrad; 1989. (In Russ)]
2. Krause D, Scadden D, Preffer L. The Hematopoietic Stem Cell Niche — Home for Friend and Foe. *Clin Cytometry*. 2012;58(7):7–20. doi: 10.1002/cyto.b.21066.
3. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804–15. doi: 10.1056/nejmra041720.
4. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575–83. doi: 10.1056/NEJMoa075290.
5. Asplund SL, McKenna RW, Howard M, Croft SH. Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(5):624–9. doi: 10.1097/0000478-200205000-00008.
6. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005;90(3):391–9.
7. Бакиров Б.А. Клинико-патогенетическая характеристика и факторы прогноза в развитии и течении хронического лимфолейкоза: Автореф. ... д-ра мед. наук. СПб., 2013.  
[Bakirov BA. Kliniko-patogeneticheskaja harakteristika i faktory prognoza v razviti i techenii hronicheskogo limfoleikoza. (Clinico-pathological characteristics and prognostic factors in development and course of chronic lymphocytic leukemia.) [dissertation] Saint Petersburg; 2013. (In Russ)]
8. Hallek M, Cheson BD, Cotovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):544–6. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
9. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Флударабин в терапии различных вариантов неходжкинских лимфом. *Современная онкология*. 2011;13(4):13–9.  
[Bessmeltsev SS, Abdulkadirov KM. Fludarabine in treatment different variants non-Hodgkin's lymphoma. *Sovremennaya onkologiya*. 2011;13(4):13–9. (In Russ)]
10. Бессмельцев С.С. Современные методы диагностики и лечения больных хроническим лимфолейкозом. *Вестник гематологии*. 2011;1:137–56.  
[Bessmeltsev SS. Modern methods of diagnosis and treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Vestnik gematologii*. 2011;1:137–56. (In Russ)]
11. Семенова Н.Ю. Морфологические особенности интрамедуллярных стромальных структур гемопоэтической ниши и элементов лимфоидной стромы при хроническом лимфолейкозе: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2015.  
[Semenova NYu. Morfologicheskie osobennosti intramedullyarnykh stromal'nykh struktur gemo-poeticheskoi nishi i elementov limfoidnoi stromy pri khronicheskom limfoleikoze. (Morphological features of intramedullary stromal structures of hematopoietic niche and elements of the lymphoid stroma in chronic lymphocytic leukemia.) [dissertation] Saint Petersburg; 2015. (In Russ)]
12. Amin S, Parker A, Manu J. Zap 70 in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9):1654–8. doi: 10.1016/j.biocel.2007.05.016.
13. Wolowiec D, Wozniak Z, Potoczek S. Bone marrow angiogenesis and proliferation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26(5):263–70.
14. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. М., 1984. 238 с.  
[Chertkov IL, Gurevich OA. Stvolovaya krovetvornaya kletka i ee mikrookruzenie. (Hematopoietic stem cell and its microenvironment). Moscow; 1984. 238 p. (In Russ)]
15. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*. 1992;49(5):225–33. doi: 10.1111/j.1600-0609.1992.tb00053.x.
16. Gothard D, Greenhough J, Ralph E. Prospective isolation of human bone marrow stromal cell subsets: A comparative study between Stro-1-, CD146- and CD105-enriched populations. *J Tissue Eng*. 2014;5(0): doi: 10.1177/2041731414551763.
17. Purton LE, Scadden DT. The hematopoietic stem cell niche. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008. pp. 1–14. doi: 10.3824/stembook.1.28.1.
18. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. The hematopoietic microenvironment: osteoblasts and the hematopoietic microenvironment. *Hematology*. 2000;4(5):421–6.
19. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(1):19–27. doi: 10.1016/j.beha.2006.11.001.
20. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Биология ниши гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология*. 2014;7(4):501–10.  
[Semenova NYu, Bessmeltsev SS, Rugal' VI. Biology of hematopoietic stem cell niche. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(4):501–10. (In Russ)]
21. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem*. 2008;283(15):9499–503. doi: 10.1074/jbc.R700043200.
22. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть 1. *Клиническая онкогематология*. 2013;6(3):237–58.  
[Bessmeltsev SS. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part I. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2013;6(3):237–58. (In Russ)]
23. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю. и др. Структурные особенности паренхимы и стромы костного мозга больных множественной миеломой. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2012;13:515–523.  
[Rugal VI, Bessmeltsev SS, Semenova NYu, et al. Parenchyma and stroma bone marrow structural features in patients with multiple myeloma. *Biomeditsinskii zhurnal Medline.ru*. 2012;13:515–23. (In Russ)]
24. Duhrsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol*. 1996;73(2):53–70. doi: 10.1007/s002770050203.
25. Weisberg E, Azab AK, Manley PW, et al. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia*. 2012;26(5):985–90. doi: 10.1038/leu.2011.360.
26. Белянин В.Л., Цыплаков Д.Э. Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов. СПб., Казань, 1999. 328 с.  
[Belyanin VL, Tsyplakov DE. Diagnostika reaktivnykh giperplazii limfaticeskikh uzlov. (Diagnosis of reactive hyperplasia of lymph nodes.) Saint Petersburg, Kazan; 1999. 328 p. (In Russ)]
27. Киселева М.В. Морфо-функциональное состояние стромы лимфатических узлов при некоторых лимфолиферативных заболеваниях: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2001.  
[Kiseleva MV. Morfo-funktsionalnoe sostoyanie stromy limfaticeskikh uzlov pri nekotorykh limfoproliferativnykh zabolevaniyah. (Morphofunctional state of the stroma of lymph nodes in certain lymphoproliferative diseases.) [dissertation] Saint Petersburg; 2001. (In Russ)]
28. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(5):2036–41. doi: 10.1182/blood-2004-05-1715.
29. Коган Е.А. Автономный рост и прогрессия опухолей. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002;12(4):45–9.  
[Kogan EA. Autonomous growth and progression of tumors. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2002;12(4):45–9. (In Russ)]
30. Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е. Морфологическая диагностика лимфом. СПб.: Коста, 2006. С. 45–8.  
[Krivolapov YuA, Leenman EE. Morfologicheskaya diagnostika limfom. (Morphological diagnostics of lymphomas.) Saint Petersburg: Kosta Publ.; 2006. pp. 45–8. (In Russ)]
31. Мухина М.С., Пожариский К.М., Леенман Е.Е. и др. Место дендритных клеток в микроокружении при лимфоме Ходжкина. *Архив патологии*. 2010;2:3–7.  
[Mukhina MS, Pozhariskii KM, Leenman EE, et al. Place of dendritic cells in the microenvironment in Hodgkin lymphoma. *Arkhiv patologii*. 2010;2:3–7. (In Russ)]
32. Park CS, Choi YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre. *Immunology*. 2005;114(1):2–10. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.02075.x.
33. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor

proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563–74. doi: 10.1182/blood-2010-05-284984.

34. Cordone I, Matutes E, Catovsky D. Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. *Leukemia*. 1992;6(9):902–6.

35. Tavassoli M, Fridenstein A. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol*. 1983;15(2):195–203. doi: 10.1002/ajh.2830150211.

36. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol*. 2011;32(7):315–20. doi: 10.1016/j.it.2011.03.009.

37. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631–44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025.

38. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195–201. doi: 10.1172/jci28568.

39. Wei J, Wunderlich M, Fox C, et al. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*. 2008;13(6):483–95. doi: 10.1016/j.ccr.2008.04.020.

40. Westen H, Beinton DF. Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow granulocytic precursors. *Exp Med*. 1979;150(4):919–37. doi: 10.1084/jem.150.4.919.

41. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994;179(5):1677–82. doi: 10.1084/jem.179.5.1677.

42. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836–41. doi: 10.1038/nature02041.

43. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, et al. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*. 2004;20(6):707–18. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.001.

44. Дризе Н.И. Различия между лейкозными и нормальными кроветворными стволовыми клетками. *Онкогематология*. 2006;1(2):5–9.

[Drize NI. Difference between leukemic and normal hematopoietic stem cells. *Onkogematologiya*. 2006;1(2):5–9. (In Russ)]

45. Mraz M, Zent CS, Church AK, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol*. 2011;155(1):53–64. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08794.x.

46. Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*. 2008;111(8):3923–30. doi: 10.1182/blood-2007-08-078147.

47. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat Biotechnol*. 2010;28(3):275–80. doi: 10.1038/nbt.1607.

48. Вартанян Н.Л., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю., Ругаль В.И. Мезенхимальные стромальные клетки при апластической анемии, гемобластозах и негематологических опухолях. *Бюллетень СО РАМН*. 2014;34(6):17–26.

[Vartanyan NL, Bessmel'tsev SS, Rugal' VI, Semenova NYu. Mesenchymal stromal cells in aplastic anemia, hematological malignancies and non-hematological tumors. *Byulleten' SO RAMN*. 2014;34(6):17–26. (In Russ)]

49. Raaijmakers M, Mukherjee S, Guo SH, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and leukemia. *Nature*. 2010;464(7290):852–7. doi: 10.1038/nature08851.

50. Герасимова Л.П., Дризе Н.И., Лубкова О.Н. и др. Нарушение стромального микроокружения у больных с различными заболеваниями системы крови. *Гематология и трансфузиология*. 2008;53(5):59–62.

[Gerasimova LP, Drize NI, Lybkova ON, et al. Stromal microenvironment impairment in patients with various hematological diseases. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2008;53(5):59–62. (In Russ)]

