

## ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООКРУЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

Виктор Иванович РУГАЛЬ<sup>1</sup>, Станислав Семенович БЕССМЕЛЬЦЕВ<sup>1</sup>,  
Наталья Юрьевна СЕМЕНОВА<sup>1</sup>, Сергей Васильевич ГРИЦАЕВ<sup>1</sup>,  
Иван Иванович КОСТРОМА<sup>1</sup>, Натэлла Иосифовна ЕНУКАШВИЛИ<sup>2</sup>,  
Анна Вадимовна ЧУБАРЬ<sup>3</sup>, Дмитрий Александрович ИВОЛГИН<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России  
193024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

<sup>2</sup> Институт цитологии РАН  
194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

<sup>3</sup> Покровский банк стволовых клеток  
199106, г. Санкт-Петербург, Большой просп. В.О., 85

**Цель исследования** – оценить морфофункциональные особенности опухолевого микроокружения и культуральные характеристики мезенхимных стромальных клеток (МСК) у пациентов с множественной миеломой (ММ) до и после терапии. **Материал и методы.** Изучена паренхиматозная и стромальная ткань костного мозга в трепанобиоптатах подвздошной кости 32 больных ММ в возрасте от 48 до 78 лет (медиана возраста 56 лет) до и после терапии заболевания. В работе использовались гистологические, иммуногистохимические и культуральные методы исследований. **Результаты и их обсуждение.** У всех пациентов установлены изменения стромального микроокружения костного мозга: увеличение плотности микрососудов, количества эндостальных стромальных клеток, усиление ретикулинового фиброза. Повышенный ангиогенез коррелирует с количеством плазматических клеток в миелограмме ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ), с типом инфильтрации костного мозга ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ), а также с остеодеструктивными изменениями в анамнезе больного ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ). Показаны существенные изменения в культурах МСК как до, так и после терапии, включая аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В МСК костного мозга больных ММ по сравнению со здоровыми донорами были снижены скорость пролиферации (в среднем в 2,4 раза) и общее время пассирования (с 7 до 5 пассажей), увеличена экспрессия маркеров, ассоциированных с миофибробластоподобным фенотипом и старением (гладкомышечный актин,  $\beta$ -галактозидаза). **Заключение.** Культуры МСК и нишеформирующие элементы костного мозга пациентов с ММ обладают чертами опухоль-ассоциированного микроокружения, несмотря на проведенное лечение основного заболевания.

**Ключевые слова:** множественная миелома, костный мозг, ниша гемопоэтических стволовых клеток, АутоТГСК, микроокружение, ангиогенез.

**Ругаль В.И.** – д.м.н., проф., зав. лабораторией по изучению лейкозов, e-mail: sciencerrugal@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4967-2601>

**Бессмельцев С.С.** – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, e-mail: bessmeltsev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6013-2422>

**Семенова Н.Ю.** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории по изучению лейкозов, e-mail: semenova@mlc-lab.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4069-0678>

**Грицаев С.В.** – д.м.н., руководитель Республиканского центра трансплантации костного мозга, e-mail: gritsaevsv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7586-4709>

**Кострома И.И.** – к.м.н., научный сотрудник, e-mail: obex@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3768-0831>

**Енукашвили Н.И.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии клетки, группа некодирующей ДНК, e-mail: natellae@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5971-7917>

**Чубарь А.В.** – лаборант, e-mail: annachubar95@gmail.com

**Иволгин Д.А.** – к.м.н., зав. лабораторией выделения стволовых клеток, e-mail: medcenter@stemcellbank.spb.ru

Множественная миелома (ММ) – самый распространенный вид моноклональных гаммапатий, заболеваемость которой неуклонно растет. Каждый год в России регистрируется около 1,9 на 100 000 человек в год новых случаев заболевания. ММ на сегодняшний день является неизлечимым заболеванием, смертность от нее составляет более 10 000 человек в год. Субстрат опухоли – трансформированные плазматические клетки, подавляющие нормальный гемопоэз и продуцирующие патологический белок [1, 2].

Лечение ММ ведется разными методами, к которым относятся таргетная и биологическая терапия, химиотерапия, лучевая терапия, кортикостероиды, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК). АутоТГСК, один из наиболее эффективных методов терапии, позволяет существенно уменьшить объем клеток патологического клона и повысить качество ответа [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении заболевания, большое количество схем и протоколов, остаются группы пациентов с неэффективной АутоТГСК – лица с неудачной мобилизацией и с ранним рецидивом после АутоТГСК (в течение 6 месяцев после проведения процедуры). Успех АутоТГСК зависит от многих причин и сопутствующих особенностей течения заболевания, протоколов мобилизации и проведения процедуры. Среди этих факторов также стоит отметить состояние микроокружения – ниши гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поврежденной вследствие основного заболевания, а также подвергшейся токсическому воздействию агрессивного лечения.

Проблема взаимоотношений «микроокружение – стволовая клетка» является одной из актуальнейших в современной биологии и медицине. Ключевыми структурами, определяющими развитие ГСК и их коммитированных в лимфоидном направлении потомков, являются нишеформирующие элементы стромального микроокружения костного мозга (КМ) [3, 10–12].

Впервые идея ниши была обозначена относительно ГСК в 1978 г. R. Schofield. Ниша ГСК имеет структурно-анатомические и функциональные характеристики. Она обеспечивает длительное, на протяжении всей жизни организма, самоподдержание стволовых клеток, регулирует их дифференцировочный и пролиферативный потенциал. ГСК могут циркулировать в кровеносном русле и, находясь практически в любых тканях и органах, тем не менее функционируют в качестве стволовых клеток только при нахождении в определенном микроокружении (нише). Понимание гемопоэтической ниши значительно улучшилось

за последние несколько лет, что, по крайней мере частично, связано с развитием новых методов клеточных исследований [3, 5, 6, 10–12].

В формировании ниши принимают участие многие типы клеток, включая остеобласты, остеокласты, адипоциты, клетки эндотелия, ретикулярные клетки CXCL12+ (CAR-клетки), мезенхимальные стромальные клетки (МСК), симпатические нервные волокна. Выделяют эндостальную и васкулярную ниши КМ. В нишах ГСК могут находиться в состоянии покоя, а могут активно пролиферировать. Регуляторный эффект стромального микроокружения КМ осуществляется путем прямых контактов стромальных клеток с кроветворными предшественниками, а также посредством нарабатываемых стромой гуморальных факторов стимуляции и ингибирования процессов пролиферации и дифференцировки ГСК. Сложная сеть сигнальных путей регуляции ГСК в настоящее время является предметом интенсивных исследований [8, 10–12].

Микроокружение опухоли в динамике приобретает новые морфофункциональные характеристики в ответ на изменения в молекулярной биохимии, генетическом профиле и разнообразии типов опухолевых клеточных популяций. Считается, что опухоль и микроокружение тесно взаимодействуют и влияют на характеристики друг друга [3, 9, 10]. Микроокружение опухоли содержит несколько клеточных типов, включая МСК, остеобласты и остеокласты (располагаются в эндостальной зоне), адипоциты и различные типы иммуномодулирующих клеток (например, макрофаги, НК-клетки, регуляторные Т-клетки и т.д.). Опухолевое микроокружение влияет на рост и пролиферацию, миграцию, тип инфильтрации опухолевых клеток, обеспечивая структурную и питательную поддержку за счет выработки цитокинов, хемокинов, адипокинов (например, адипонектин и лептин), факторов роста (например, IL-6, IGF-1, VEGF, TNF- $\alpha$  и SDF-1), белков внеклеточного матрикса, лигандов к клеточным рецепторам сигнальных путей и других молекул. Все это в совокупности может влиять на приобретение лекарственной устойчивости злокачественных клеток.

Таким образом, изучение морфофункциональных особенностей стромального микроокружения КМ при ММ имеет значение как для теоретической, так и для практической гематологии. Цель исследования – оценить морфофункциональные особенности опухолевого микроокружения и культуральные характеристики МСК у пациентов с ММ до лечения и после терапии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили цельные фрагменты подвздошной кости 32 больных ММ в возрасте от 48 до 78 лет (медиана возраста 56 лет). Пациенты были разделены на группы: 1-я группа – дебют заболевания (впервые выявленная ММ, больные, не получавшие терапию, медиана возраста 55 лет, 20 человек); 2-я группа – прогрессирующая ММ после проведенного лечения (химиотерапия по схемам VD, CVD, АутоТГСК, 12 пациентов в возрасте 52–68 лет, медиана 57 лет). Во 2-й группе рецидив заболевания отмечался в течение 6–18 мес., у трех пациентов – ранний рецидив (в течение 6 мес.) после АутоТГСК. У четырех человек при повторной подготовке к АутоТГСК отмечались неэффективные мобилизации при сборе клеток CD34+, у трех пациентов повторные сборы клеток CD34+, у одного пациента – неудачный сбор. Стадии ММ оценивались по Международной системе стадирования ISS (2005). В 1-й группе преобладали пациенты с III стадией по ISS – девять человек (45 %), со II стадией было восемь больных (40 %), с I стадией – три (15 %). Во 2-й группе пациентов со II и III стадией было одинаковое количество – по пять человек (42 %), два человека с I стадией (16 %). Контрольную группу при изучении КМ составили фрагменты подвздошной кости 15 здоровых лиц (доноров костного мозга) 38–55 лет (медиана возраста 45 лет). Контрольная группа сопоставима по полу, возрасту и национальности с основной.

В работе использовались гистологические, иммуногистохимические и культуральные методы исследований. При анализе трепанобиоптатов применялись окраски гематоксилином и эозином, азуром II и эозином, импрегнация серебром по Массону. Иммуногистохимические реакции проводили по стандартной методике, основываясь на рекомендациях фирм-производителей первичных антител. Выполняли общепринятые отрицательные и положительные контрольные процедуры при обработке параллельных срезов. Пациентам из 2-й группы были проведены культуральные исследования. Из аспирата КМ выде-

ляли ядродержащие клетки, которые культивировали в питательной среде по стандартным методикам с последующей оценкой культуральных характеристик МСК.

Морфометрические исследования паренхиматозных и стромальных элементов кроветворной ткани КМ осуществлялись с использованием пакета программ «ВидеоТест-Морфология 5.2» (Россия). Анализ гистологических препаратов проводился в 20 полях зрения при увеличении  $\times 40$  для каждого образца.

Статистическая обработка полученных данных проводилась методом вариационной статистики с определением средней величины  $M$  и средней ошибки  $m$ , связь между различными признаками в исследуемой выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ). Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе морфологического исследования трепанобиоптатов КМ у большинства пациентов (27 человек, 84 % в выборке) было выделено два типа поражения КМ: интерстициальный и диффузный. У 16 % больных (пять человек) определялись единичные опухолевые клетки в КМ. Интерстициальный тип миеломного поражения характеризовался наличием плазматических клеток, расположенных среди элементов нормального гемопоэза, без изменения соотношения с жировой тканью. Диффузный тип поражения диагностировался в случаях массивной инфильтрации миеломными клетками интрамедуллярных пространств, которая сопровождалась редукцией жировой ткани с замещением костно-мозговых пространств плазмочитами и различной степенью угнетения гемопоэза.

При анализе 1-й группы пациентов отмечалась корреляция между типом инфильтрации КМ и некоторыми клинико-лабораторными показателями (табл. 1). При диффузной инфильтрации КМ наблюдалось большее количество плазматических клеток в миелограмме ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,05$ ),

Таблица 1

Инфильтрация костного мозга опухолевыми клетками и взаимосвязь с клинико-лабораторными показателями

Инфильтрация костного мозга опухолевыми клетками	Количество пациентов	Количество клеток CD138+ в миелограмме, %	Количество пациентов с остеодеструктивным синдромом, %
Диффузная	18	21,25 (6,1–47)	44
Интерстициальная	9	7,86 (2,4–12)	30
Единичные клетки CD138+	5	1,95 (0,4–3,6)	20

Морфометрические показатели структур костного мозга подвздошной кости в зависимости от типа опухолевой инфильтрации

Структуры костного мозга	Здоровые лица, $n = 15$	1-я группа пациентов		2-я группа пациентов	
		ИИ, $n = 5$	ДИ, $n = 13$	ИИ, $n = 5$	ДИ, $n = 13$
Площадь гемопоэтической ткани (в том числе опухолевой), %	$37,8 \pm 3,15$	$40,1 \pm 3,9$ ( $19,4 \pm 5,4$ )	$45,2 \pm 3,1^*$ ( $38,3 \pm 5,7$ )	$36,4 \pm 3,1$ ( $18,3 \pm 3,7$ )	$31,1 \pm 4,3^*$ ( $27,3 \pm 3,2$ )
Площадь жировой ткани, %	$34,1 \pm 2,2$	$34,4 \pm 2,5$	$30 \pm 3,4$	$37,1 \pm 3,2^*$	$41,1 \pm 3,7^*$
Площадь костной ткани, %	$21,0 \pm 2,41$	$17,3 \pm 1,5$	$14,6 \pm 2,15$	$13,8 \pm 3,4^*$	$12,6 \pm 2,7^*$
Площадь сосудов микроциркуляции, %	$7,1 \pm 1,2$	$8,2 \pm 2,4$	$10,2 \pm 2,3^*$	$12,7 \pm 2,3^*$	$15,2 \pm 2,8^*$
Количество эндостальных клеток на единицу площади	$1,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,5^*$	$2,5 \pm 0,3^*$	$2,7 \pm 0,4^*$

Примечание. ИИ – интерстициальная инфильтрация; ДИ – диффузная инфильтрация; \* – отличие от величины соответствующего показателя здоровых лиц статистически значимо при  $p < 0,05$ .

чаще определялся остеодеструктивный синдром в анамнезе ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ). Корреляции типа инфильтрации КМ с уровнем альбумина и  $\beta 2$ -микроглобулина у исследуемых пациентов выявлено не было.

Анализ стромальных структур микроокружения свидетельствовал об изменении состояния стромы при всех типах поражения интрамедуллярной паренхимы (табл. 2). В табл. 2 не вошли данные по группе пациентов с единичной инфильтрацией КМ, так как объем выборки не позволял статистически оценить значимость изменений. Интерстициальная инфильтрация КМ плазмодитами сопровождалась увеличением количества интрамедуллярных ретикулярных клеток, наличием ретикулиновых волокон, разбросанных в паренхиме без формирования склеротической сети, отмечались участки деструкции коллагена трабекул без статистически значимого уменьшения объема костной ткани. В эндотелии микрососудов, включая синусы, явных перестроек не наблюдалось, тем не менее количество микрососудов было умеренно увеличено по сравнению с контролем (соответственно  $8,2 \pm 2,4$  и  $7,1 \pm 1,2$  %;  $p > 0,05$ ). Повышение статистически не значимо, вероятно, ввиду небольшой выборки пациентов в этой группе. Выраженные изменения стромальной ткани КМ регистрировались при диффузной инфильтрации. Определялось усиление ретикулинового склероза, увеличение плотности микрососудов ( $10,2 \pm 2,3$  %;  $p < 0,05$ ), нарастание числа эндостальных клеток с уплощенными ядрами, нарушение структуры коллагена трабекул костной ткани. Площадь костных балок была снижена на 4–8 %, однако уменьшение остеогенной ткани не было статистически значимым ( $p > 0,05$ ).

Площадь жировой ткани у пациентов 1-й группы достоверно не отличалась от контроля, в то время как во второй группе она статистически

значимо увеличена (соответственно  $37,1 \pm 3,2$ ,  $34,1 \pm 2,2$  и  $41,1 \pm 3,7$  %), что, вероятно, связано с ответом на проведенную терапию заболевания. Остеолизис у пациентов с ММ встречался двух типов – гладкая костная резорбция и лакунарное рассасывание, с преобладанием первого типа (61 %). Остеолизис наблюдался у пациентов со всеми типами инфильтрации КМ, и встречались случаи ярко выраженного остеолизиса при минимальном поражении КМ опухолевыми клетками. Ретикулиновый рисунок у пациентов всех групп был увеличен по сравнению с контролем. Миелофиброз 1-й или 2-й стадии отмечался у девяти пациентов (45 %) из 1-й группы и у восьми пациентов (68 %) из 2-й группы. Площадь сосудов КМ при диффузной инфильтрации КМ была больше, чем в контроле. Повышенный ангиогенез коррелировал с количеством плазматических клеток в миелограмме ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ), с типом инфильтрации КМ ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ), а также с остеодеструктивными изменениями в анамнезе больного ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ).

Среди 12 пациентов с прогрессирующей ММ после лечения (пять мужчин и семь женщин) в возрасте 52–68 лет (медиана 56 лет) у трех человек объем поражения КМ не превышал 10 %, в четырех случаях объем опухолевых клеток составил 20–30 % и у пяти больных обнаружена диффузная инфильтрация более 50 %. У всех пациентов определялось увеличенное количество микрососудов в паренхиме КМ и в субэндостальной зоне –  $12,7 \pm 2,3$  % при интерстициальной инфильтрации и  $15,2 \pm 2,8$  % при диффузной по сравнению с  $7,1 \pm 1,2$  % в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). На эндосте отмечалось повышение количества клеток на единицу длины костной трабекулы –  $2,5 \pm 0,3$  при интерстициальной инфильтрации и  $2,7 \pm 0,4$  при диффузной по сравнению с  $1,4 \pm 0,2$  в контроле ( $p < 0,05$ ). Также в субэндо-



стальной зоне и вокруг синусов КМ наблюдалось увеличение экспрессии коллагена IV типа и зоны ярко выраженного ретикулинового склероза. Показано сокращение площади костной ткани до  $12,6 \pm 2,7$  % по сравнению с  $21,0 \pm 2,41$  % в контрольной группе.

Таким образом, у пациентов после лечения сохраняются нарушения в клетках микроокружения КМ. Полученные данные по увеличению площади сосудов после лечения согласуются с данными О.С. Покровской и соавторов [4], которые показали, что плотность микрососудов в КМ перед АутоТГСК служит более важным прогностическим показателем, чем уровень секреции парапротеина и содержание плазматических клеток в КМ. В нашей выборке пациентов с прогрессирующей ММ после проведенного лечения у всех пациентов отмечалось увеличение площади сосудов в 1,5 раза и более, в то время как инфильтрация КМ CD138-позитивными клетками по данным трепанобиоптатов и миелограмм была очень вариабельна. Данные, полученные на материале трепанобиоптатов пациентов с ММ, повторяют тенденции, выявленные при исследовании стромы КМ у пациентов с хроническим лимфолейкозом [7]. Также при усилении инфильтрации отмечалось увеличение количества сосудов, повышение количества и активности клеток в эндостальной зоне. Морфологически были определены изменения стромальных нишеобразующих элементов: площадь сосудистого компонента, увеличение количества эндостальных клеток, усиление ретикулинового рисунка. При этом эти особенности сохранялись и после проведенного лечения.

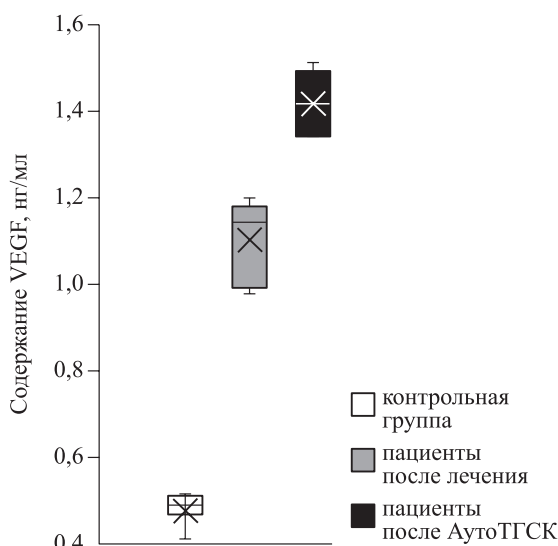
Культуральные исследования МСК КМ пациентов с ММ из 2-й группы, проведенные после мобилизации для сбора стволовых клеток для подтверждения или опровержения выявленных повреждений нишеобразующих структур, показали, что их пролиферативная активность и потенциал деления статистически не отличались от величин соответствующих показателей контрольной группы доноров КМ, хотя в самой группе пациентов наблюдались существенные колебания количества колониеобразующих единиц гранулоцито-моноцитарного ряда (КОЕ-ГМ) от  $39 \times 10^5$  до  $300 \times 10^5$  клеток. Отсутствие корреляции с другими показателями и сильная вариабельность показателя КОЕ-ГМ свидетельствуют о многофакторности и сложности взаимодействия клеток микроокружения и требуют дальнейшего изучения.

При культуральных исследованиях показано снижение скорости пролиферации МСК КМ больных ММ по сравнению со здоровыми донорами (в среднем в 2,4 раза), уменьшение общего времени пассирования с 7 до 5 пассажей. После

АутоТГСК пролиферативная активность сильно варьирует в разных культурах. После лечения только у небольшой части больных (17 %) происходило восстановление кривой роста до показателей доноров.

Остеогенная дифференцировка у пациентов с остеодеструктивным синдромом в анамнезе и диффузной инфильтрацией снижена по сравнению с контролем, в группе пациентов без остеодеструкции близка к нормальным значениям.

Независимо от остеодеструктивного синдрома у всех исследованных пациентов после индукционной терапии и перед АутоТГСК отмечалось усиление экспрессии маркеров, ассоциированных с миофибробластоподобным фенотипом и старением (гладкомышечный актин,  $\beta$ -галактозидаза) – 45–80 % клеток в культуре положительно окрашивались этими маркерами. В культурах МСК пациентов после АутоТГСК  $\beta$ -галактозидаза синтезировалась слабее, чем до лечения, но тем не менее интенсивнее, чем в контрольной группе. МСК КМ здоровых доноров данный фермент практически не синтезировали. Фибриллы гладкомышечного актина выявлялись в МСК КМ до АутоТГСК, а после нее практически отсутствовали. Содержание VEGF в культурах МСК коррелировало с площадью микрососудов, определенной морфологическим методом ( $r = 0,68$ ;  $p < 0,05$ ). После индукционной терапии оно было больше, чем у лиц группы контроля, и оставалось повышенным после проведения АутоТГСК (рисунок).



**Рис.** Содержание VEGF в культурах МСК от пациентов после индукционной терапии ММ и после проведенной АутоТГСК в сравнении с контролем. Крестики – средние значения, горизонтальные линии – медианы, прямоугольники – межквартильный интервал, «усы» – минимальные и максимальные значения

Результаты, полученные в культуральных исследованиях, дополняют и подтверждают данные морфологических исследований и свидетельствуют о вовлечении структур васкулярной и эндостальной ниши в прогрессию заболевания. В данной работе показано, что ниша ГСК в КМ у больных с ММ отличается от таковой у здоровых доноров КМ. Морфофункциональные особенности основных элементов ниши КМ могут быть причиной нарушений в регуляции развития ГСК и их приживления при АутоТГСК. Дальнейшие исследования стромальной ниши ГСК в динамике заболевания и в условиях применения современных схем терапии позволят получить дополнительные данные о патогенетической роли нишеобразующих структур в регуляции В-лимфопоэза.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что культуры МСК и нишеформирующие элементы КМ пациентов с ММ обладают чертами опухоль-ассоциированного микроокружения, причем как до, так и после проведенного лечения, включая АутоТГСК.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-6706.2018.7.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (лечение первичных больных): обзор литературы и собственные данные. Часть 2 // Клин. онкогематология. 2013. 6. (4). 379–414.

2. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома: руководство для врачей. М.: МК, 2016. 504 с.

3. Герасимова Л.П., Дризе Н.И., Лубкова О.Н. Нарушения стромального микроокружения у больных с различными заболеваниями системы крови // Гематология и трансфузиология. 2008. 53. (5). 59–62.

4. Покровская О.С., Менделеева Л.П., Капланская И.Б., Грибанова Е.О., Варламова Е.Ю., Обухова Т.Н., Гемджян Э.Г., Савченко В.Г. Ангиогенез в костном мозге больных множественной миеломой на различных этапах высокодозной химиотерапии // Клин. онкогематология. 2010. 3. (4). 347–353.

5. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С. Оценка опухолевой инфильтрации костного мозга при множественной миеломе по результатам исследования трепанобиоптатов // Вестн. гематологии. 2009. 5. (1). 49–50.

6. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Артюхина З.Е., Ругаль В.И. Состояние структур гемопоэтической ниши при множественной миеломе // Клин. онкогематология. 2017. 10. (4). 577–578.

7. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Роль дефектов кроветворной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза // Клин. онкогематология. 2016. 9. (2). 176–190.

8. Bessmeltsev S., Rugal V. Stromal microenvironment and stem cell niches in multiple myeloma // Haematologica. 2010. 95. (25). 569–570.

9. De Raeye H.R., Vanderkerken K. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma // Histol. Histopathol. 2005. 20. 1227–1250.

10. Ellis S.L., Grassinger J., Jones A., Borg J., Camenisch T., Haylock D., Bertoncello I., Nilsson S.K. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature // Blood. 2011. 118. (6). 1516–1524.

11. Huang M.-M., Zhu J. The regulation of normal and hematopoietic stem cells by niches // Cancer Microenviron. 2012. 5. (3). 295–305.

12. Yin T., Li L. The stem cell niches in bone // J. Clin. Invest. 2006. 116. (5). 1195–1201.

## CHARACTERISTICS OF BONE MARROW MICROENVIRONMENT IN MULTIPLE MYELOMA BEFORE AND AFTER TREATMENT

Viktor Ivanovich RUGAL<sup>1</sup>, Stanislav Semenovich BESSMELTSEV<sup>1</sup>,  
Natalya Yurevna SEMENOVA<sup>1</sup>, Sergey Vasilevich GRITSAEV<sup>1</sup>,  
Ivan Ivanovich KOSTROMA<sup>1</sup>, Natella Iosifovna ENUKASHVILI<sup>2</sup>,  
Anna Vadimovna CHUBAR<sup>3</sup>, Dmitriy Aleksandrovich IVOLGIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of FMBA of Russia  
193024, Saint-Petersburg, 2-ya Sovetskaya str., 16*

<sup>2</sup> *Institute of Cytology of RAS  
194064, Saint-Petersburg, Tikhoretsky av., 4*

<sup>3</sup> *Pokrovsky Stem Cell Bank  
199106, Saint-Petersburg, Bol'shoy av. V.O., 85*

---

The purpose of the study is to evaluate the morphological and functional features of the tumor microenvironment and the cultural characteristics of mesenchymal stromal cells (MSC) of patients with multiple myeloma (MM) before and after treatment. **Material and methods.** Parenchymal and stromal bone marrow tissue in iliac bone trepanobiopsy of 32 patients with MM aged from 48 to 78 years (median age 56 years) before and after treatment was investigated. The study applied histological, immunohistochemical and cultural methods. **Results and discussion.** Changes of stromal microenvironment of bone marrow in all patients with MM have been revealed: increased microvascular density and the number of endosteal stromal cells, strengthening of reticulin fiber in subendosteal and perivascular spaces. Increased angiogenesis correlates with the number of plasma cells in the myelogram ( $r = 0.58$ ;  $p < 0.05$ ) and with the type of bone marrow infiltration ( $r = 0.85$ ;  $p < 0.05$ ), as well as with osteodestructive changes in the patient's history ( $r = 0.65$ ;  $p < 0.05$ ). Significant changes in MSC cultures, both before and after therapy, including autologous hematopoietic stem-cell transplantation, were shown. Bone marrow MSC of patients with MM had decreased speed of proliferation (2.4 times on average), total time of passaging from 7 to 5 passages, increased expression of markers associated with myofibroblastic phenotype and aging (smooth muscle actin,  $\beta$ -galactosidase) compared to healthy donors. **Conclusion.** MSC cultures and BM niche forming elements of patients with MM have signs of tumor-associated microenvironment, despite the treatment of the underlying disease.

---

**Key words:** multiple myeloma, bone marrow, hematopoietic stem cell niche, AutoHSCT, microenvironment, angiogenesis.

*Rugal V.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory for the study of leukemia,  
e-mail: sciencerrugal@gmail.com*

*Bessmeltsev S.S. – doctor of medical sciences, professor, deputy director for research, e-mail: bessmeltsev@yandex.ru*

*Semenova N.Yu. – candidate of biology sciences, researcher at the laboratory for the study of leukemia,  
e-mail: semenova@mlc-lab.ru*

*Gritsaev S.V. – doctor of medical sciences, head of the Republican center of bone marrow transplantation,  
e-mail: gritsaevsv@mail.ru*

*Kostroma I.I. – candidate of medical sciences, researcher, e-mail: obex@rambler.ru*

*Enukashvili N.I. – candidate of biology sciences, senior researcher at the laboratory of cell morphology non-coding  
DNA group, e-mail: natellae@gmail.com*

*Chubar A.V. – technician of Pokrovsky stem cell bank, e-mail: annachubar95@gmail.com*

*Ivolgin D.A. – candidate of medical sciences, head of the laboratory of stem cell isolation Pokrovsky stem cell bank,  
e-mail: medcenter@stemcellbank.spb.ru*