

Сохранение фертильности у пациенток, перенесших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток

Л.И. Папуша, Е.С. Младова, Л.В. Хилькевич, Д.Н. Балашов, А.А. Масчан, М.А. Курцер

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравсоцразвития России; Перинатальный медицинский центр, Москва

Введение. Женщины, перенесшие трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), в репродуктивном периоде сталкиваются с проблемой бесплодия, обусловленного, в первую очередь, повреждением фолликулярного аппарата яичников химиотерапевтическими препаратами. Цель работы – разработка и внедрение в практику метода сохранения фертильности у пациенток подросткового возраста после ТГСК, сохранивших регулярный менструальный цикл, однако имеющих признаки снижения овариального резерва.

Материалы и методы. Было обследовано 37 пациенток в возрасте от 14 до 21 года (средний возраст 16 лет), перенесших ТГСК при лечении острого лейкоза (ОЛ). Всем участникам исследования проводили оценку овариального резерва антимюллерова гормона (АМГ), исследование количества антральных фолликулов. Криоконсервацию ооцитов прово-

дили посредством витрификации с помощью метода Cryotop (Kuwayama, 2005).

Результаты и обсуждение. У всех больных ($n = 25$), получивших бусульфан в режиме кондиционирования, развился вторичный гипергонадотропный гипогонадизм (вторичная аменорея). Пациентки, получившие мельфалан ($n = 12$), имели регулярный менструальный цикл, однако показатели овариального резерва у них были резко снижены: содержание АМГ $0,6 \pm 0,2$ нг/мл, количество антральных фолликулов $4,08 \pm 1,67$. У 5 больных, имеющих снижение овариального резерва, выполнена витрификация ооцитов, полученных в циклах с мягкими протоколами стимуляции.

Заключение. Витрификация ооцитов может рассматриваться как метод сохранения фертильности у пациенток подросткового возраста после ТГСК, что позволит реализовать репродуктивную функцию с собственными, а не донорскими ооцитами.

Анализ стромальных клеток-предшественников у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Н.А. Петинати, Л.А. Кузьмина, И.Н. Шипунова, Е.Н. Паровичникова, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

Введение. Кроветворение в костном мозге происходит в постоянном взаимодействии с мезенхимными стромальными клетками. Возрастные изменения в кроветворении зависят от состояния кроветворного микроокружения. Повреждения стромального микроокружения при гемобластозах, после высокодозной химиотерапии и после облучения затрагивают клетки-предшественники кроветворной стромы. Изменения стромальных клеток-предшественников у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) исследованы недостаточно. Целью данной работы было изучение динамики изменения концентрации колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) в костном мозге и кумулятивной клеточной продукции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) у больных в течение года после алло-ТГСК.

Материалы и методы. Анализ КОЕф и ММСК был проведен у 17 больных (6 мужчин и 11 женщин в возрасте от 17 до 60 лет, медиана 34 года): 2 больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), 6 – острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), 5 – острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), 1 – острым недифференцированным лейкозом (ОНдЛ), 1 – острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ), 1 – В-хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ), 1 – апластической анемией (АА). После подписания информированного согласия больными, во время стандартных диагностических процедур костный мозг был аспирирован до алло-ТГСК (точка 0) и через 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 360 дней после алло-ТГСК. КОЕф из костного мозга тестировали стандартным методом, ММСК культивировали в среде α -МЕМ с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Кумулятивную клеточную продукцию определяли за 5 пассажей.

Результаты и обсуждение. Концентрация КОЕф и параметры роста ММСК у больных до трансплантации отличались от таковых у доноров и были снижены для КОЕф в 1,5 раза, а для кумулятивной продукции ММСК в 5 раз. Через 30 дней после алло-ТГСК концентрация КОЕф у больных снижалась

более чем в 4 раза по сравнению с таковой до трансплантации. Затем концентрация КОЕф в костном мозге больных постепенно повышалась и через год достигала 75% от значения до алло-ТГСК. Динамика изменений концентрации КОЕф не зависела от режима кондиционирования и возраста пациентов. Однако в группе больных, которым с целью профилактики острой реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) дополнительно вводили ММСК, концентрация КОЕф была выше, чем у больных только со стандартной профилактикой, в течение всего времени наблюдения, причем различия были наиболее выражены через 6 мес и через год после алло-ТГСК. Параметры роста ММСК у доноров и больных статистически значимо различались. До алло-ТГСК средняя продолжительность пассажа ММСК у больных была в 1,5 раза больше, чем у доноров. Через 30 дней после алло-ТГСК время пассажа увеличивалось в 3 раза, а затем очень медленно уменьшалось в течение года. Кумулятивная продукция ММСК больных после алло-ТГСК снизилась еще в 5 раз. ММСК больных в возрасте до 35 лет пролиферировали гораздо эффективнее, чем в старшей возрастной группе, что было особенно выражено через год после алло-ТГСК. Повышение клеточной продукции в культурах ММСК от больных, получивших дополнительную профилактику острой РТПХ с помощью ММСК, может быть связано с меньшим повреждением стромального микроокружения. Время роста ММСК было увеличено у больных после алло-ТГСК в течение всего времени наблюдения.

Заключение. Полученные данные демонстрируют существенное повреждение стромальных клеток-предшественников у больных после алло-ТГСК. Ни концентрация КОЕф, ни параметры роста ММСК не достигают исходного уровня в течение года после трансплантации. Неполноценная регенерация стромального микроокружения после алло-ТГСК может быть одной из причин нарушений процесса кроветворения у этих больных. Необходимость дальнейших исследований очевидна.

Характеристика цитогенетических изменений в клетках костного мозга, мезенхимальных стромальных клетках и лимфоцитах периферической крови у больных миелодиспластическим синдромом и острым миелобластным лейкозом

М.А. Пименова, А.В. Кохно, Е.В. Домрачева, Н.И. Дризе, Т.Е. Манакова, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

Введение. Миелодиспластический синдром (МДС) и острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – заболевания, харак-

теризующиеся клональными нарушениями на уровне стволовой кроветворной клетки. У 40–70% больных МДС и ОМЛ

при цитогенетическом исследовании клеток костного мозга обнаруживаются изменения кариотипа. В мезенхимальных стромальных клетках (МСК), выделенных из костного мозга, в 10–45% описаны аномалии кариотипа. Эти аномалии могут быть клональными или спонтанными (неклональными). При исследовании кариотипа лимфоцитов периферической крови выявляют конституциональные поломки, в небольшом проценте могут быть выявлены клональные и неклональные перестройки.

Материалы и методы. В настоящей работе представлен анализ результатов исследований образцов, полученных от 16 больных МДС в возрасте от 19 до 76 лет (медиана возраста 61 год) [6 – рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ), 7 – рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД), 2 – МДС с изолированной делецией 5q, 1 – рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС)] и 4 больных ОМЛ. Цитогенетическое исследование (ЦИ) выполняли методом G-banding и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). МСК получали из мононуклеарных клеток костного мозга путем культивирования в матрасах после 2–5 пассажей. Для исследования кариотипа лимфоцитов крови проводили реакцию бласттрансформации путем стимуляции лимфоцитов ТРА (12-tetradecanoylphorbol-13-acetate) и ФГА (phytohaemagglutinin).

Результаты и обсуждение. ЦИ клеток костного мозга было проведено у 19 из 20 больных. У 8 (42%) больных определен нормальный кариотип, у 11 (58%) выявлены аномалии кариотипа: у 9 больных – клональные изменения кариотипа (у 2 больных – 7 изолированная и у 1 – 7 в составе комплексных хромосомных нарушений, у 1 – del(5q),

у 1 больного – i(14), у 1 – inv3(q21q26), у 3 больных – комплексные нарушения кариотипа), у 1 больного выявлена конституциональная перестройка (inv9(p13q21)) и еще у 1 больного – при нормальном кариотипе методом FISH выявлена del(5q). У 1 больного методом G-banding митозов не получено, однако методом FISH выявлены del(5q) и del(7q). Цитогенетическое исследование МСК выполнено у 20 больных, у 17 (85%) больных выявлен нормальный кариотип, у 3 (15%) выявлены аномалии кариотипа: у 1 – конституциональная перестройка (inv9(p13q21)), у 1 – неклональные изменения (46XY,t(2;22)(p10;q11)) в одной метафазе и еще у 1 – клональные изменения кариотипа (46XY,add(2q)) в 7 метафазах из 20. Исследование кариотипа ФГА- и ТРА-стимулированных лимфоцитов выполнено у 14 больных. У 12 больных (86%) выявлен нормальный кариотип, у 2 больных (14%) выявлены аномалии: у 1 – конституциональная перестройка (inv9(p13q21)), у 1 – неклональные изменения в одной метафазе – t(1;8?)(p25?;q13).

Заключение. Аномалии кариотипа (клональные и неклональные) у больных МДС и ОМЛ могут определяться в разных субпопуляциях клеток. В настоящем исследовании в клетках костного мозга у 58% больных обнаружены хромосомные аномалии. Выявлено наличие спонтанных и клональных перестроек в культуре мезенхимальных стромальных клеток и лимфоцитов периферической крови, однако их процент невысок, 15% и 14% соответственно. Выявленные изменения кариотипа в данных популяциях клеток отличны от аномалий в клетках костного мозга. У 1 больного выявлена конституциональная инверсия 9 хромосомы, которая определялась во всех исследуемых популяциях клеток.

Адаптация тромбоцитопоза доноров к процедурам тромбоцитафереза

В.М. Погорелов, В.Ю. Бескорвайнова, Э.Г. Гемджян, М.Ж. Алексанян, Г.И. Козинец

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва.

Введение. В литературе мало данных относительно ответа тромбоцитопоза у доноров тромбоцитов, хотя считается, что активность кроветворения при донации тромбоцитов (PLT) отражается у уровнем фракции незрелых тромбоцитов (IPF). В настоящей работе проведено сравнение уровней IPF и PLT в связи с тромбоцитаферезом (ТЦФ), предназначенным для заготовки тромбоцитных концентратов (ТК).

Материалы и методы. Было обследовано 276 мужчин: 87 контрольной группы (медиана возраста 26 лет) и 187 доноров. Группа доноров состояла из: 1) первичных (24 человека, с одной кроводачей в анамнезе, медиана возраста 23 года), из лейкоцитарно-тромбоцитарного слоя периферической крови которых впервые поэтапным фракционированием трех доз крови (2052 мл) в течение 80 мин на центрифуге Sorvall RS 3C (США) получали от 150 до 250 мл (4 единицы дозы) пулированных монодонорских ТК; 2) кадровых (медиана возраста 23 года), у которых пулированные монодонорские ТК заготавливались регулярно в среднем от 2 до 5 лет; 3) других кадровых (медиана возраста 37 лет), ТК (около 400 мл, 8 доз) от которых в течение 2–3 лет заготавливались (на сепараторе крови MCS3p™ "Haemonetics") из 3100–3900 мл крови. Повторные ТЦФ проводили с интервалами в среднем в 2 нед. Венозная кровь (7 мл) в вакутейнерах с K₃-ЭДТА автоматически анализировалась на приборе Sysmex ХЕ-2100 ("Sysmex", Япония) в режиме "CBC + Ret". Количество тромбоцитов (PLT, × 10³/мкл) и значения IPF (%) при получении пулированных ТК регистрировали перед набором каждого из трех контейнеров; в случае прерывисто-поточной сепарации крови (афереза) – до и по окончании процедуры. Данные представлены в виде средних значений, стандартных ошибок средних и 95% доверительных интервалов (95% ДИ); статистическую значимость различий межгрупповых средних оценивали по *t*-критерию

Стьюдента (для зависимых и независимых выборок); при оценке распределения на нормальность использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. В работе установлены два факта. Во-первых, у всех доноров после проведения ТЦФ отмечено достоверное ($p = 0,05$) по сравнению с контролем, но клинически незначимое снижение числа тромбоцитов: в 1-й группе $PLT = 189 \pm 52 \times 10^3/\text{мкл}$ (95% ДИ 167–211), во 2-й группе $189 \pm 44 \times 10^3/\text{мкл}$ (95% ДИ 175–202) и в 3-й группе $166 \pm 30 \times 10^3/\text{мкл}$ (95% ДИ 160–171) против 234 ± 38 (95% ДИ 226–242) в контроле. Наиболее выражено количество тромбоцитов снизилось после афереза: $240 \pm 44 \times 10^3/\text{мкл}$ (95% ДИ 2,1–2,6) и $166 \pm 30 \times 10^3/\text{мкл}$ (95% ДИ 160–171). Во-вторых, до проведения ТЦФ в периферической крови доноров доля незрелых тромбоцитов (IPF, %) по сравнению с контролем оказалась статистически значимо ($p = 0,05$) увеличенной: $1,8 \pm 1,5$ (95% ДИ 1,2–2,5) в 1-й группе; $2,2 \pm 1,1$ (95% ДИ 1,8–2,5) во 2-й группе; $2,3 \pm 1,4$ (95% ДИ 2,1–2,6) в 3-й группе против $1,6 \pm 0,9$ (95% ДИ 1,4–1,8) в контроле. В динамике 3-кратного ТЦФ величина IPF продолжала увеличиваться, но у кадровых доноров после процедуры аппаратного афереза этот показатель снизился: $1,8 \pm 1,5$ (95% ДИ 1,2–2,5) против $2,4 \pm 1,5$ (95% ДИ 1,7–3) и $3,4 \pm 2,2$ (95% ДИ 2,4–4,3) в 1-й группе; $2,2 \pm 1,1$ (95% ДИ 1,8–2,5) против $2,6 \pm 1,4$ (95% ДИ 2,1–3) и $2,8 \pm 1,4$ (95% ДИ 2,4–3,3) во 2-й; $2,3 \pm 1,4$ (95% ДИ 2,1–2,6) против $1,8 \pm 1,8$ (95% ДИ 2,3–3) в 3-й группе.

Заключение. Исходя из полученных результатов, можно считать, что адаптация тромбоцитопоза, происходящая у первичных доноров за счет реализации незрелых тромбоцитов, закрепляется у кадровых доноров и в течение 2 недель "отдыха" надежно компенсирует потребности организма в клеточном звене гемостаза.