

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.419-007.17-008.6-089.843-018.46-091.8

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КРОВЕТВОРЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО КОСТНОГО МОЗГА ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ

В.Н. Двирнык, Л.А. Кузьмина, А.В. Кохно, Е.Н. Гласко, Э.Г. Гемджян, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Резюме. Цель исследования — изучение морфологических особенностей кроветворения у больных миелодиспластическими синдромами (МДС) в разные сроки после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) с кондиционированием пониженной интенсивности. У 10 больных первичными МДС исследованы пунктаты (98 образцов) и трепанобиоптаты (ТБ) (94 образца) костного мозга (КМ) и проведены морфологические исследования кроветворной ткани непосредственно перед алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности и в разные сроки после нее. У больных МДС после алло-ТГСК отмечено быстрое вытеснение «хозяйского» кроветворения и восстановление гемопоэза, обусловленные приживлением донорского трансплантата. Несмотря на проведение кондиционирования в режиме пониженной интенсивности, на ранних и поздних сроках после алло-ТГСК выявляли гипоплазию кроветворной ткани, которая, очевидно, связана с повреждением стромального микроокружения, что ограничивает полное восстановление гемопоэтической ткани. После алло-ТГСК отмечена хорошая репарация эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения, в то же время выявлено неполное восстановление мегакариоцитарного ростка. Наблюдалась значительная редукция диспластических изменений кроветворных клеток. Тем не менее небольшие обратимые вторичные диспластические изменения наблюдали в эритрокариоцитах. В мегакариоцитах также имелись диспластические изменения, которые носили более стойкий характер и обнаруживались как на ранних, так и на поздних этапах после алло-ТГСК. Сравнительный анализ данных миелограмм и ТБ показал, что восстановление кроветворной ткани после алло-ТГСК у больных МДС происходило примерно в те же сроки, что и при других гемобластозах. Гипоплазия кроветворной ткани после трансплантации наблюдалась у большинства больных в течение всего периода наблюдения. Морфологическое исследование признаков дисплазии различных ростков кроветворения у больных МДС обнаружило значительную редукцию дисмиелопоэза после алло-ТГСК.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы; трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток; цитология; гистология.

HEMOPOIESIS MORPHOLOGY AFTER TRANSPLANTATION OF ALLOGENIC BONE MARROW IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

V.N. Dvirnyk, L.A. Kuzmina, A.V. Kokhno, E.N. Glasko, E.G. Gemdzhyan, E.N. Parovichnikova

Hematology Research Center, Moscow, Russia

Summary. The morphology of hemopoiesis was studied in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) during different periods after transplantation of allogenic hemopoietic stem cell (allo-HSC) with conditioning of low intensity. Bone marrow aspirate specimens (n = 98) and bone marrow biopsy specimens (n = 94) were studied in 10 patients with primary MDS. Morphologic studies of hemopoietic tissue were carried out directly before allo-HSC transplantation with low intense conditioning and during different periods after transplantation. Rapid replacement of the host hemopoiesis and hemopoiesis recovery were observed in MDS patients after allo-HSC transplantation due to healing of the donor transplant. Despite conditioning in the low intensity mode, hemopoietic tissue hypoplasia was detected during the early and late periods after transplantation, presumably because of stromal microenvironment damage, this limiting complete recovery of hemopoietic tissue. Good reparation of the erythroid and granulocytic hemopoiesis stems was observed after allo-HSC transplantation. The recovery of megakaryocytic stem was incomplete. Dysplastic changes in hemopoietic cells reduced significantly. Slight reversible secondary dysplastic changes were however found in erythrokaryocytes. In megakaryocytes the dysplastic changes were more stubborn and detected during the early and late stages after allo-HSC transplantation. Comparative analysis of bone marrow aspirate and biopsy specimens indicated that hemopoietic tissue recovery after allo-HSC transplantation in MDS patients developed during about the same periods as in other hematological malignancies. Hemopoietic tissue hypoplasia after allo-HSC transplantation was observed in the majority of patients over the entire period of observation. Morphologic studies of the signs of dysplasia of various hemopoietic stems in MDS showed significant reduction of dysmyelopoiesis after allo-HSC transplantation.

Key words: myelodysplastic syndromes; allo-HSC transplantation; cytology; histology.

Под миелодиспластическими синдромами (МДС) понимают разнородную группу клональных заболеваний кроветворной ткани, характери-

зующуюся неэффективным гемопоэзом и повышенным риском трансформации в острый лейкоз (ОЛ). Медиана времени выживаемости для больных, относящихся к группе промежуточного II и высокого рисков (по международной прогностической шкале International Prognostic Scoring System, IPSS), составляет 14 и 5 мес, время до момента трансформации заболевания в ОЛ — 3 года и 5 мес соответственно [1].

Для корреспонденции:

Двирнык Валентина Николаевна, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России.

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а.

Телефон: +7(495) 612-63-93.

E-mail: vdvirnyk@mail.ru

Терапия МДС разнообразна. В зависимости от варианта заболевания, морфологических особенностей кроветворной ткани, факторов риска, возраста больного, а также соматического статуса используют как поддерживающую терапию, так и иммунодепрессанты, химиотерапевтические, дифференцировочные, гипометилирующие препараты [2]. Тем не менее риск прогрессии заболевания не снижается [3].

Единственным радикальным методом терапии больных МДС является трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Длительная безрецидивная выживаемость больных МДС с благоприятным прогнозом достигает 60—70%, с неблагоприятным — менее 50%. Частота рецидивов заболевания составляет 35—40% [4, 5]. Применение алло-ТГСК ограничивается рядом факторов: пожилым возрастом больных (доля больных старше 60 лет составляет 65%), наличием серьезной сопутствующей патологии, а также отсутствием HLA-идентичных доноров [6]. Результаты трансплантации существенно зависят от характера цитопении, количества бластных клеток в костном мозге (КМ), цитогенетической характеристики больного (индексы по шкалам IPSS и M. Anderson), гистологических особенностей кроветворной ткани (включающих выраженный диффузный фиброз КМ), перегрузки железом, обусловленной трансфузиями эритроцитов, а также от терапии, предшествующей трансплантации [7—10].

В конце XX века были разработаны новые режимы кондиционирования со сниженной интенсивностью у больных гемобластомами из группы повышенного риска. Снижение интенсивности режимов кондиционирования позволило значительно уменьшить число осложнений алло-ТГСК и применять этот вид лечения у больных старшей возрастной группы, которым проведение трансплантации в стандартных режимах не представлялось возможным [11—14].

Режим кондиционирования приводит к гибели большей части гемопоэтической ткани, а также повреждает стромальное микроокружение хозяина. Гибель клеток сопровождается процессом приживления и компенсаторно-восстановительного роста кроветворной ткани донора, пролиферацией ее клеток [15].

Время приживления трансплантата зависит от вида трансплантата, количества гемопоэтических клеток, степени повреждения стромального микроокружения и ряда других факторов. Признаки донорского гемопоэза у реципиентов после алло-ТГСК отмечаются на 12—23-е сутки. Первыми, обычно через 2—3 нед, восстанавливаются, по результатам исследования трепанобиоптатов (ТБ), эритроидные клетки. Затем, на 3—4-й неделе, появляются клетки гранулоцитарного ряда и несколько позже — мегакариоциты. Более позднее восстановление гранулоцитопоэза связано с повреждением стромы вследствие проведенного предтрансплантационного кондиционирования. Это повреждение затрудняет поддержание репопуляции клеток CD34⁺, CD38 [16].

Одним из основных осложнений после ТГСК с кондиционированием в режиме пониженной интенсивности являются рецидивы заболевания, частота которых в течение 3 лет после трансплантации составляет 45%

[10, 17, 18]. Другим серьезным осложнением является острая и хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), которая развивается у 40—80% больных [10, 17, 19, 20]. По данным литературы [21, 22], РТПХ препятствует восстановлению кроветворной ткани и тем самым снижает динамику восстановления гемопоэза после алло-ТГСК. Также отмечено более частое выявление пролифератов лимфоидных клеток в ТБ у больных с РТПХ по сравнению с таковым у больных без РТПХ [23].

Совокупная морфологическая характеристика кроветворения, как цитологическая, так и гистологическая, особенно в отдаленные периоды после алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности, у больных МДС в литературе отражена достаточно фрагментарно.

В Гематологическом научном центре (ГНЦ) Минздрава России (Москва) алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности применяется с 2000 г. [24]. Поскольку предтрансплантационное кондиционирование наряду с эрадикацией опухолевых клеток сопряжено с повреждением нормальной кроветворной ткани и ее стромального микроокружения, возникает важная задача оценки костномозгового кроветворения как на этапе первоначального повреждения КМ, наблюдаемого после проведения предтрансплантационного кондиционирования, так и на разных этапах восстановления гемопоэза после алло-ТГСК.

Цель настоящего исследования — изучение морфологических особенностей кроветворения у больных МДС в разные сроки после проведения алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности, а также оценка количественных и качественных показателей восстанавливающейся кроветворной ткани с учетом опасности развития РТПХ.

Материалы и методы

Проанализировали 98 пунктатов и 94 ТБ КМ, полученных у 10 больных первичными МДС (5 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 17 до 64 лет (медиана возраста 41 год). Всем больным провели алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности (9 больных получали флударабин, бусульфан, антифлотицидин, глобулин; 1 больной получал флударабин, циклофосфан и антифлотицидин, глобулин). Исследование выполнено в отделении высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ГНЦ (Москва) с 2000 по 2011 г. Среднее время от момента диагностики заболевания до проведения алло-ТГСК составило 13 мес (3—61 мес). До выполнения алло-ТГСК специфическую терапию по поводу заболевания проводили 7 больным: 4 больных получали циклоспорин, 1 — эритропозин, 1 — децитабин (1 курс), 1 — однократное введение флударабина. У 3 больных специфическое лечение по поводу заболевания не проводили.

Изменения кариотипа при стандартном цитогенетическом исследовании в дебюте заболевания выявлены у 5 больных: у 2 больных наблюдалась делеция 7-й хромосомы, у 1 больного выявлено отсутствие 7-й хромосомы, у 1 больного — инверсия 5-й хромосомы, у 1 больного — трисомия 8-й хромосомы. По международной прогностической системе (IPSS) к группе высокого риска были отнесены 2 больных, к группе промежуточного-2 риска — 3 больных, к группе промежуточного-1 риска — 5 больных.

Предтрансплантационный режим кондиционирования включал флударабин (в суммарной дозе 180 мг/м²), бусульфид (в суммарной дозе 8 мг/кг), антитимоцитарный глобулин (в дозе 40 мг/кг) и циклофосфан (в дозе 900 мг/м²).

У 8 больных источником трансплантата был КМ: им было перелито (2,6–4,1) • 10⁸/кг ядросодержащих клеток аллогенного КМ, у 2 больных — периферические стволовые клетки крови (ПСКК): одному больному перелито 3,6 • 10⁶/кг ПСКК, другому — 10,5 • 10⁶/кг.

Показатели периферической крови (ПК) у больных восстановились за период от 13 до 45 дней после алло-ТГСК. Профилактику РТПХ у большинства больных проводили циклоспорином А (при начальной дозе 3 мг/кг в сутки в течение 3–6 мес) в сочетании с метотрексатом (15 мг/м² в +1-й день после ТГСК и 10 мг/м² в +3, +6 и +11-й дни после ТГСК). У 5 больных в качестве профилактики РТПХ дополнительно использовали селлсепт (мофетила микофенолат) в начальной дозе 2 г/сут.

Всем больным до проведения алло-ТГСК (непосредственно перед кондиционированием) и в контрольные сроки после трансплантации (через 1, 2, 3, 6, 12 и 24 мес) выполняли клинический анализ крови, морфологическое и гистологическое исследования КМ. После трансплантации также проводили цитогенетические, молекулярные исследования, а также мониторинг лейкоцитарного и эритроцитарного химеризмов.

Информацию о костно-мозговом кроветворении в дебюте заболевания получали при исследовании аспирата КМ из грудины и билатеральной трепанобиопсии, а в дальнейшем — аспирата КМ из грудины и односторонней трепанобиопсии.

Цитологическое исследование пунктата КМ включало подсчет не менее 500 клеток.

Оценку дисплазии элементов КМ проводили в соответствии с критериями, предложенными J. Goasquen и соавт. [25] и принятыми в качестве стандарта в классификации ВОЗ с 2001 г. [26]. Дисплазию эритроидного, гранулоцитарного и дисплазию мегакариоцитарного (ДМ) рядов кроветворения диагностировали при наличии более 10% измененных форм [27]. В гранулоцитарном и эритроидном ростках анализировали не менее 100 клеток, в мегакариоцитарном — не менее 20 клеток.

Проводя сравнительный анализ кроветворения, оценивали следующий ряд лабораторных признаков:

— в ПК: показатель гемоглобина (Hb), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание Hb в эритроците (MCH), количество нейтрофилов и тромбоцитов, а также процент бластных клеток и лимфоцитов;

— в пунктате КМ: клеточность КМ, процент бластных клеток, относительное количество всех клеток гранулоцитарного ряда, индекс созревания нейтрофилов, относительное число всех клеток эритроидного ряда, индекс созревания эритрокариоцитов, лейкоэритробластическое соотношение, выраженность дисплазии клеток в трех ростках кроветворения.

— в ТБ: клеточность кроветворной ткани, соотношение ростков кроветворения, наличие признаков миелодисплазии; изменения стромы, включая увеличение количества лимфоцитов в виде интерстициальной или нодулярной инфильтрации, количество плазматических клеток и макрофагов, наличие миелофиброза.

При статистическом анализе данных использовали методы описательной статистики и сравнения распреде-

лений признаков. Критический уровень статистической значимости (*p*) выбран равным 0,05. Данные представлены преимущественно в виде медианы и минимального и максимального значений признака в выборке.

Результаты и обсуждение

Приживление трансплантата в результате алло-ТГСК достигнуто у 9 из 10 больных. У всех больных получена клинико-гематологическая ремиссия длительностью от 3 мес до 11 лет (медиана 3 года). В течение периода времени после алло-ТГСК умерли 5 больных: 2 — от рецидива основного заболевания (через 33 и 42 мес соответственно); 2 — от тяжелых инфекционных осложнений, развившихся на фоне экстенсивной формы хронической РТПХ (через 13 и 31 мес); 1 больной, у которого наблюдалась несостоятельность трансплантата (возможно, вследствие вирусной инфекции), умер в состоянии глубокой аплазии кроветворной ткани через 3 мес. Продолжительность жизни других 5 больных составила на начало 2012 г. от 2 до 11 лет (медиана 6 лет); у всех у них сохранялась полная клинико-гематологическая ремиссия.

Несмотря на применение режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью, в различных исследованиях отмечено быстрое вытеснение хозяйского кроветворения и восстановление гемопоэза, обусловленные приживлением донорского трансплантата [10]. В нашем исследовании мы также отмечали достаточно быстрое восстановление показателей ПК (**табл. 1**).

Период агранулоцитоза составил 13–45 дней (медиана 17 дней). Основные показатели ПК были в пределах нормы начиная с +30-го дня. Несмотря на раннюю, по данным ТБ, репарацию клеток эритроидного ряда, наблюдалось небольшое снижение концентрации гемоглобина (до 92 г/л) на +30-й день. Нормальный или расширенный эритроидный росток у большинства больных наблюдался уже с +30-го дня и сохранялся таковым в течение всего периода посттрансплантационного мониторинга. Начиная с +90-го дня все показатели ПК у большинства больных были в норме, что говорит о раннем восстановлении донорского гемопоэза после проведения алло-ТГСК с кондиционированием пониженной интенсивности.

Одним из показателей восстановления кроветворной ткани после алло-ТГСК является ее клеточность. Мы провели сравнительную оценку клеточности КМ на разных этапах после алло-ТГСК. За исходную принимали величину клеточности непосредственно перед кондиционированием (**табл. 2**).

До алло-ТГСК, по данным ТБ, клеточность КМ превышала возрастную норму у 5 больных, у 4 — была снижена, у 1 больного наблюдалось сочетание гиперклеточности с очаговой гипоплазией кроветворной ткани. По результатам исследования пунктата КМ, повышенная клеточность КМ наблюдалась лишь у 1 больного, сниженная — у 5, нормальная — у 4 больных. За период наблюдения до +90-го дня отмечено значительное снижение клеточности КМ у подавляющего числа больных, более отчетливо выявленное по данным ТБ (в 22 из 24 случаев). По результатам исследования пунктата КМ в 16 (67%)

Таблица 1

Показатели периферической крови до алло-ТКМ в режиме кондиционирования со сниженной интенсивностью и в разные сроки после нее

Время оценки показателей	Число больных	Гемоглобин, г/л	Гранулоциты, • 10 ⁹ /л	Тромбоциты, • 10 ⁹ /л
Перед алло-ТГСК	10	66 (29—82)	0,9 (0,3—12)	35 (15—55)
После алло-ТГСК:				
+30 дней	10	92 (51—99)	2,5 (0,3—4,7)	164 (35—272)
+60 дней	10	109 (99—137)	3,8 (0,8—5,7)	180 (76—305)
+90 дней	10	121 (86—144)	3,9 (1—5,9)	172 (12—252)
+180 дней	10	124 (61—142)	5,3 (0,6—8,9)	184 (27—232)
+1 год	9	130 (111—144)	4,9 (1,5—6,6)	203 (68—283)
+2 года	8	128 (111—157)	3,9 (3,1—5,2)	197 (77—301)

из 24 случаев клеточность КМ была нормальной. В клеточном составе наблюдали относительное увеличение эритрокариотиков с наличием в них немногочисленных эритробластов и клеток мегалоидного вида. В течение периода времени от полугода до 2 лет после алло-ТГСК гипопластические изменения кроветворной ткани в ТБ наблюдали практически у всех больных. Только в 2 случаях клеточность кроветворной ткани после алло-ТГСК была нормальной: у 1 больного нормализация была зафиксирована на +180-й день (в дальнейшем клеточность была снижена во все периоды наблюдения), у 1 больного — на +2-й год после алло-ТГСК. По результатам исследования пунктата КМ клеточность КМ снизилась начиная с +180-го дня и в более поздние сроки у 16 (62%) из 26 больных. Таким образом, на разных сроках после алло-ТГСК имела гипоплазия кроветворной ткани, более часто выявляемая в ТБ, чем в пунктате КМ.

Гипоплазия кроветворной ткани в ранние сроки после ТКМ, вероятно, обусловлена предтрансплантационным кондиционированием. Не зарегистрировано аплазии КМ, которая, по данным литературы [24], чаще выявляется у реципиентов после миелоаблативных режимов. При пониженной клеточности КМ показатели ПК у большинства больных были тем не менее нормальными в течение всего периода наблюдения.

Несмотря на то, что предтрансплантационное кондиционирование проводили в режиме пониженной интенсивности, даже на поздних сроках (до 11 лет) отмечали сохраняющуюся гипоплазию кроветворной ткани, которая, очевидно, связана с повреждением стромального микроокружения, что ограничивает полное восстановление гемопоэтической ткани. Как показано в работах Е.О. Грибановой и соавт. [21, 22], клеточность кроветворной ткани у больных ОЛ после алло-ТКМ до исходного предтрансплантационного уровня не восстанавливалась даже в отдаленные (до 10 лет) сроки.

У 3 больных наблюдали отсроченное (от 33 до 45 дней) приживание трансплантата КМ, из них у 2 развилась острая РТПХ II—IV степени с поражением кожи, кишечника, печени. При этом статистически значимых различий показателя клеточности КМ у больных с

выраженной РТПХ по сравнению с аналогичным показателем у больных без РТПХ не обнаружено. По данным Е.О. Грибановой [21], восстановление гемопоэза в КМ остается отсроченным до лечения РТПХ.

Поскольку миелоаблативный режим кондиционирования позволил избежать выраженной аплазии кроветворной ткани и значительных токсических осложнений (часто сопровождающих стандартные режимы), он обеспечил достаточно быстрое формирование смешанного гемопоэтического химеризма с постепенным вытеснением хозяйского кроветворения и замещением его донорским кроветворением [28, 29]. Динамика восстановления различных ростков кроветворения представлена в табл. 3.

Восстановление эритроидного ростка кроветворения наблюдали начиная с +30-го дня после алло-ТГСК. Несмотря на некоторое расширение эритроидного ростка (в 30% случаев), медиана показателя Hb в ПК составляла на +30-й день после алло-ТГСК 92 г/л. Таким образом, донорский эритропоэз на +30-й день все еще не был вполне эффективным. Во все последующие этапы наблюдения отмечалось полное эффективное восстановление эритроидного ростка.

Репарация клеток гранулоцитарного ряда происходила уже на +30-й день после алло-ТГСК. На +60-й день в большинстве случаев отмечалось угнетение гранулоцитарного ростка, при этом гранулоцитопоз сам по себе был вполне эффективен и снижения количества гранулоцитов в ПК не наблюдалось. Начиная с 3-го месяца относительное коли-

Таблица 2

Изменения клеточности костного мозга после алло-ТГСК

Время оценки клеточности	Число больных	Число больных с указанной клеточностью								
		клеточность КМ в пунктате				клеточность КМ в трепанобиоптате				
		гипо	нормо	гипер	не оценено	гипо	нормо	гипер	гипо/гипер	не оценено
Перед алло-ТГСК	10	5	4	1	0	4	0	5	1	0
После алло-ТГСК:										
+30 дней	10	5	5	0	0	8	0	0	1	1
+60 дней	10	4	6	0	0	6	1	0	0	3
+90 дней	10	2	8	0	0	8	0	0	0	2
+180 дней	10	5	5	0	0	5	1	0	1	3
+1 год	9	6	3	0	0	8	0	0	0	1
+2 года	8	5	2	0	1	6	1	0	0	1

Таблица 3

Изменения количественного состава ростков кроветворения в пунктате костного мозга до и после алло-ТГСК

Время оценки ростков кроветворения от момента алло-ТКМ	Число больных	Сумма всех эритроидных клеток, % (медиана, разброс)	Сумма всех гранулоцитарных клеток, % (медиана, разброс)	Количество мегакариоцитов в 1 мазке (медиана, разброс)
Перед алло-ТГСК	10	32 (5—58,8)	37,8 (2,8—48,4)	8,5 (0—132)
После алло-ТГСК:				
+30 дней	10	25,6 (11,5—44,8)	50 (13,5—68,8)	1,5 (0—46)
+60 дней	10	27 (1,5—64)	36,8 (11,6—72,5)	4,5 (0—41)
+90 дней	10	16 (1,2—32,5)	58,4 (38,5—71,5)	5 (0—61)
+180 дней	10	19,4 (2—35,8)	63 (27—81)	9 (0—33)
+1 год	9	16,8 (7,5—30,8)	61,3 (49,6—77)	7 (0—78)
+2 года	8	26,5 (6—44)	64 (41,5—72,5)	25 (0—105)

чество клеток гранулоцитарного ростка становилось устойчиво нормальным. На хорошее восстановление гранулоцитопоза практически во всех случаях указывают нормальные значения абсолютного количества нейтрофилов в ПК после алло-ТГСК.

При исследовании мегакариоцитарного ростка в пунктате КМ количество мегакариоцитов в мазках после алло-ТГСК было статистически значимо ($p = 0,05$), но ниже нормальных значений и лишь спустя примерно 2 года стало возрастать. По результатам исследования ТБ не выявлено снижение количества мегакариоцитов на всех этапах наблюдения после алло-ТГСК, при этом в большей части этих клеток имелись морфологические признаки дисплазии, такие как микроформы или формы с гипосегментацией ядра, что, по-видимому, связано с нарушением стромального компонента. Возможно, снижение количества мегакариоцитов может быть связано и с реактивацией вирусной инфекции, в том числе цитомегаловирусной. Несоответствие между показателями пунктата и трепанобиоптата КМ отмечено и другими исследователями [15, 30]. ТБ высокого качества позволяют получить более полноценную информацию о состоянии кроветворной ткани у больных после алло-ТГСК.

В задачи исследования также входило изучение таких особенностей восстановленной кроветворной ткани, как морфология диспластических прояв-

ний кроветворных клеток. Алло-ТГСК способствует максимальной эрадикации опухолевых клеток, но в то же время опухолевые клетки и интенсивная химиотерапия, предшествующая алло-ТГСК, повреждают и нормальную кроветворную ткань, и стромальное микроокружение. Помимо этого, вторичные обратимые диспластические изменения (например, псевдопельгеровская аномалия нейтрофилов) могут возникать и вследствие терапии

препаратами, применяющимися для профилактики РТПХ (в частности, мофетилом микофенолатом) и препаратами противовирусной направленности (в частности, ганцикловиром) [31, 32].

Морфологическое исследование признаков дисплазии различных ростков кроветворения проводили непосредственно перед алло-ТГСК и в разные сроки после трансплантации. В табл. 4 приведены данные только тех больных, у которых количество клеточных форм той или иной кроветворной линии было достаточным для оценки.

В 5 пунктатах КМ у 3 больных оценить признаки дисплазии эритроидного ряда кроветворения оказалось невозможным, поскольку величина красного ростка кроветворения у этих больных составляла от 1,5 до 6% при недостаточной клеточности КМ. ТБ во всех этих случаях тоже были гипоклеточными, при этом в 1 случае красный росток был сужен и признаки дисплазии отсутствовали, в 2 случаях красный росток был нормальным и также без признаков дисплазии, в 2 случаях красный росток был расширен, в 1 из них определялись черты дизэритропоэза.

До трансплантации в эритрокариоцитах (в пунктатах КМ) чаще всего выявляли мегалобластоидные черты, которые зафиксированы потом и в ранние сроки после алло-ТГСК, что, по-видимому, связано с репарацией эритрокариоцитов в момент прижив-

Таблица 4

Изменения в процессе лечения диспластических форм в различных ростках кроветворения по данным миелограмм

Время оценки диспластических изменений	Число больных	Всего оценено миелограмм на дизэритропоэз	Эритроидный росток, % (медиана, разброс)	Всего оценено миелограмм на дисгранулоцитопоз	Гранулоцитарный росток, % (медиана, разброс)	Всего оценено миелограмм на дисмегакариопоз	Мегакариоцитарный росток, % (медиана, разброс)
Перед алло-ТГСК	10	9	29 (0—100)	9	28 (15—70)	3	80 (34—84)
После алло-ТКМ:							
+30 дней	10	9	21 (7—98)	9	8 (3—21)	1	37
+60 дней	10	8	9 (8—73)	9	7 (5—23)	3	9 (7—14)
+90 дней	10	8	7 (0—16)	10	7 (5—19)	3	12 (8—29)
+180 дней	10	8	8 (0—9)	9	6 (4—20)	4	15 (6—25)
+1 год	9	8	8 (7—9)	8	6 (3—9)	3	16 (7—25)
+2 года	8	6	7 (5—12)	6	7 (4—9)	5	20 (8—25)

ления трансплантата. В ТБ наблюдалась сходная морфологическая картина. В дальнейшем у большинства больных отмечали значительную редукцию диспластических изменений эритрокариоцитов.

В пунктатах КМ диспластичные формы гранулоцитов перед алло-ТГСК наблюдали у всех больных, максимальное количество диспластичных форм составило 70%. Чаще всего это были клетки с гипогрануляцией, значительно реже наблюдали псевдопельгероидные или гиперсегментированные формы нейтрофилов. После алло-ТГСК статистически значимо ($p = 0,05$) уменьшилось количество гранулоцитов с признаками дисплазии. У единичных больных до +180-го дня отмечали присутствие диспластичных форм, преобладала гипогрануляция нейтрофилов, максимально до 23% нейтрофилов, а через 1 год дисплазию гранулоцитов уже не выявляли. Не было зафиксировано увеличения форм с проявлениями пельгеризма у больных, получавших селсепт (мофетил микофенолат) или ганцикловир, что, вероятно, обусловлено малым количеством наблюдений.

В ТБ непосредственно перед алло-ТГСК атипично локализованные предшественники гранулоцитопоза (АЛПГ) выявлены у 5 больных, в дальнейшем АЛПГ не обнаруживали (лишь у отдельных больных отмечали небольшое нарушение созревания гранулоцитов и присутствие отдельных моноцитоподобных клеток). Таким образом, уже на ранних этапах после алло-ТГСК наблюдалась значительная редукция диспластических проявлений в клетках гранулоцитарного ряда, что, несомненно, говорит о хорошей репарации гранулоцитарного ростка кроветворной ткани.

Возможность выявить ДМ ростка кроветворения зависит от количества мегакариоцитов. Только у 3 больных в мазках пунктатов КМ количество мегакариоцитов непосредственно перед алло-ТГСК было достаточным для оценки диспластических проявлений. Чаще обнаруживали 1- и 2-ядерные формы, а также микроформы. Мегакариоциты с сепарированным ядром наблюдали реже. В разные сроки в посттрансплантационном периоде количество мегакариоцитов в пунктатах КМ также было небольшим, и оценить характер диспластических изменений было возможно лишь у небольшого числа больных. К двум годам после алло-ТГСК у 5 из 8 больных количество мегакариоцитов в пунктатах КМ было достаточным для оценки ДМ ростка кроветворения, и у большинства из них (4 больных) была выражена ДМ ростка кроветворения: чаще выявляли микроформы, несколько реже — 1-, 2-ядерные формы. При этом выраженность дисплазии по сравнению с исходной (до алло-ТГСК) была статистически значимо меньше; $p = 0,01$). По результатам исследования ТБ практически у всех больных (9 из 10) до проведения алло-ТГСК была выражена ДМ ростка кроветворения, характеризующаяся не только диспластическими чертами мегакариоцитов, но и в большинстве случаев аномальной их локализацией в паратрабекулярной зоне, вне связи с синусами. В посттрансплантационном периоде диспластические изменения мегакариоцитов в ранние сроки (к +30-му дню) наблюдали примерно у $\frac{1}{3}$ больных, к +90-му дню ДМ ростка кроветворения выявля-

ли уже у 6 из 10 больных, что, по-видимому, связано с усиленной репарацией костномозговой ткани. В более поздние сроки отдельные диспластичные формы наблюдали у половины больных, что, вероятно, связано с отдаленными проявлениями неполноценности стромального компонента и нарушениями клеточного взаимодействия после ТКМ.

Наиболее информативным методом в оценке стромального компонента кроветворной ткани, играющего важную роль как в приживлении, так и в восстановлении кроветворной ткани после алло-ТГСК, остается трепанобиопсия. По данным ТБ, изменения микроокружения до алло-ТГСК проявлялись небольшими очагами фиброза у 5 больных, у 2 из них они сохранялись и после алло-ТГСК. В 8 случаях наблюдались небольшое количество рассеянных мелких лимфоидных клеток, единичные плазмциты и макрофаги. На различных этапах посттрансплантационного периода у 5 больных выявлены мелкие очаговые скопления лимфоидных клеток, при этом клинических признаков РТПХ не было ни у одного больного.

У 1 больного мелкие очаговые скопления лимфоидных клеток были обнаружены через 180 дней после алло-ТГСК на фоне резкого снижения клеточности КМ и при выраженном уменьшении количества клеток гранулоцитарной линии. При этом иммуногистохимическое исследование ТБ выявило в 50% клеток герпесвирусы 1-го и 2-го типа и вирус Эпштейна—Барр. Через 7 мес после алло-ТГСК у этого больного наступила аплазия кроветворной ткани, и была диагностирована несостоятельность трансплантата, через 10 мес после алло-ТГСК больной умер.

Данные литературы о морфологических проявлениях РТПХ в КМ противоречивы. Согласно одним исследованиям [15], РТПХ не имеет каких-либо морфологических особенностей, в других исследованиях [21] указывается на увеличение частоты выявления и размеров пролифератов малых лимфоцитов Т-фенотипа у больных при РТПХ.

В нашем исследовании не обнаружено увеличения количества лимфоидных пролифератов у больных при РТПХ. Возможно, это связано с малым количеством наблюдений и дальнейшие исследования позволят получить более достоверные результаты.

Таким образом, нормализация показателей ПК была отмечена у большинства больных уже через 1 мес после алло-ТГСК, что свидетельствует о раннем восстановлении гемопоэза после проведения алло-ТГСК в режиме кондиционирования со сниженной интенсивностью. Восстановление гемопоэза начиналось с клеток эритроидного ряда, затем гранулоцитарного ряда. Репарация мегакариоцитов была более отсрочена.

Во все периоды после алло-ТГСК в ТБ отмечали увеличение клеток эритроидного ряда, количество же мегакариоцитов, напротив, было снижено как в пунктатах, так и в трепанобиоптатах КМ.

Несмотря на нормализацию показателей ПК, в разные сроки после алло-ТГСК наблюдалась гипоплазия кроветворной ткани, более часто выявляемая в ТБ, чем в пунктатах КМ. В отдаленные сроки после алло-ТГСК клеточность кроветворной ткани не восстанавливалась до нормальной, соответствующей

возрасту больных. Вместе с тем случаев аплазии КМ не зафиксировано.

Клеточность КМ у больных с выраженной РТПХ по сравнению с таковой у больных без РТПХ существенно не различалась, тем не менее мы наблюдали отсроченное приживание трансплантата у 2 больных с острой РТПХ.

Морфологическое исследование признаков дисплазии различных ростков кроветворения у больных МДС показало значительную редукцию проявлений дисмиелопоэза после алло-ТГСК. Признаки дисплазии эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения не выявлялись у большинства больных. Тем не менее черты ДМ ростка кроветворения сохранялись примерно у половины больных на ранних и отдаленных этапах после алло-ТГСК.

REFERENCES [ЛИТЕРАТУРА]

- Greenberg P, Cox C, LeBeau M, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89(6): 2079—88.
- Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Mihajlova E.A., Ol'shanskaja Ju.V., Ustinova E.N., Gribanova E.O., et al. Myelodysplastic syndrome: some of the pathogenesis and treatment (Mielodisplasticheskiy sindrom: nekotorye voprosy patogeneza i lecheniya). *Terapevticheskiy arkhiv*. 1996; 7: 31—7. (in Russian) [Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Михайлова Е.А., Ольшанская Ю.В., Устинова Е.Н., Грибанова Е.О. и др. Миеодиспластический синдром: некоторые вопросы патогенеза и лечения. *Терапевтический архив*. 1996; 7: 31—7].
- Warlic E.D., Smith B.D. Myelodysplastic syndromes: review of pathophysiology and current novel approaches. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2007; 7(6): 541—58.
- Runde V, de Witte T, Arnold R, Gratwohl A, Hermans J, van Biezen A, et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as first-line treatment in patients with myelodysplastic syndromes: early transplantation is associated with improved outcome. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 21(3): 225—61.
- Silver R.T., Bennett J.M., Goldman J.M., Spivak J.L., Tefferi A. The third international congress on myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res*. 2007; 31(1): 11—7.
- Germing U., Strupp C., Kundgen A., Bowen D, Aul C., Haas R., et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004; 89(8): 905—10.
- Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Cortes J, Shan J, Bennett J.M., et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original international. *Progn. Scoring Syst. Cancer*. 2008; 113(6): 1351—61.
- Armand P., Kim H.T., Cutler C.S., Ho V.T., Koreth J., Alyea E.P., et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 109(10): 4586—8.
- Kröger N., Zabelina T, van Biezen A., Brand R., Niederwieser D., Martino R., et al. Allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Haematologica*. 2011; 96(2): 291—7.
- Martino R., Lacobelli S., Brand R., Jansen T, van Biezen A., Finke J., et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006; 108(3): 836—46.
- Khouri I. F., Keating M., Korbling M., Przepiorka D., Anderlini P., O'Brien S., et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based non-ablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J. Clin. Oncol*. 1998; 16(8): 2817—24.
- Slavin S., Nagler A., Naparstek E., Kapelushnik Y., Aker M., Cividalli G., et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. *Blood*. 1998; 91(3): 756—63.
- Spitzer T.R., McAfee A., Sackstein R., Colby C., Toh H.C., Multani P., et al. International induction of mixed chimerism and achievement of anti-tumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematological malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2000; 6(3A): 309—20.
- Giralt S., Thall P. F., Khouri I., Wang X., Braunschweig I., Ippolitti C., et al. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens reduced intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood*. 2001; 97(3): 631—7.
- Kossaekowska A.E. Bone marrow pathology after bone marrow transplantation. *Przeegląd Lekarski*. 2000; (Suppl. 1): 42—4.
- O'Flaherty E., Sparrow R., Szer J. Bone marrow stromal function from patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15(2): 207—12.
- Martino R., de Wreede L., Fiocco M., van Biezen A., von dem Borne P.A., Hamladji R.M., et al. Comparison of conditioning regimens of various intensities for allogeneic hematopoietic SCT using HLA-identical sibling donors in AML and MDS with < 10% BM blasts: a report from EBMT. *Bone Marrow Transplantation*. 2013; 48(6): 761—70.
- Khabori M.A., El-Emary M., Xu W., Guyatt G., Galal A., Kurwilla J., et al. Impact of intensity of conditioning therapy in patients aged 40—60 years with AML/myelodysplastic syndrome undergoing allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46(4): 516—22.
- Barret A.G., Savani B.N. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia*. 2006; 20(10): 1661—72.
- Djulbegovic B., Siedenfeld J., Bonnell C., Kumar A. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies: a systematic review. *Cancer Control*. 2003; 10(1): 17—41.
- Gribanova E.O. Hematopoiesis after allogeneic and autologous bone marrow transplantation for acute leukemia (Krovetvorenie posle allogennoy i autologichnoy transplantatsii kostnogo mozga pri ostrykh leykozakh). *Dis. Moskva*; 2003. (in Russian) [Грибанова Е.О. Кроветворение после аллогенной и аутологичной трансплантации костного мозга при острых лейкозах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2003].
- Gribanova E.O., Glasko E.N., Ljubimova L.S., Petrov A.N., Lebedev Je.A., Kaplanskaja I.B. Histopathology of the bone marrow in patients with acute leukemia at different times after bone marrow transplantation (Gistologicheskaya kartina kostnogo mozga u bolnykh ostrymi leykozami v raznye sroki posle transplantatsii kostnogo mozga). *Problemy gematologii i perelivaniya krvi*. 2002; 4: 13—20. (in Russian) [Грибанова Е.О., Гласко Е.Н., Любимова Л.С., Петров А.Н., Лебедев Э.А., Капланская И.Б. Гистологическая картина костного мозга у больных острыми лейкозами в разные сроки после трансплантации костного мозга. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 2002; 4: 13—20].
- Sloan J.P., Norton J. The pathology of bone marrow transplantation. *Histopathology*. 1993; 22(3): 201—9.
- Demidova I.A., Parovichnikova E.N., Kut'ina R.M., Poreshina L.P., Shpakova A.P., Ol'shanskaja Yu.V., et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in low-intensity in patients with hematological malignancies (Allogennaya transplantatsiya gemopoieticheskikh stvolovykh kletok v rezhimakh ponizhennoy intensivnosti u bolnykh gemoblastozami). *Terapevticheskiy arkhiv*. 2007; 7: 48—52. (in Russian) [Демидова И.А., Паровичникова Е.Н., Кутына Р.М., Порешина Л.П., Шпакова А.П., Ольшанская Ю.В. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в режимах пониженной интенсивности у больных гемобластозами. *Терапевтический архив*. 2007; 7: 48—52].
- Goasquen J.E., Bennett J.M. Classification and morphologic features of the myelodysplastic syndromes. *Semin. Oncol*. 1992; 19(1): 4—13.
- Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. World Health Organization Classification of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARS; 2001.
- Germing U., Gattermann N., Strupp C., Aivado M., Aul C. Validation of the WHO proposals for the classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk. Res*. 2000; 24(12): 983—92.
- Maloney D.G., Sandmaier B.M., Mackinnon S., Shizuru J.A. Non-myeloablative transplantation. *Hematology Am. Soc. Hematol Educ Program*. 2002: 392—421.
- Barrett A.J., Savani B.N. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia*. 2006; 20(10): 1661—72.
- Domenech J., Roingeard F., Binet C. The mechanisms involved in impairment of hematopoiesis after autologous bone marrow transplantation. *Leuk. Lymphoma*. 1997; 24(3—4): 239—56.
- Banerjee R., Halil O., Bain B.J., Cummins D., Banner N.R. Neutrophil dysplasia caused by mycophenolat mofetil. *Transplantation*. 2000; 70(11): 1608—10.
- Taetmeyer A., Halil O., Bell A. Neutrophil dysplasia (acquired pseudo-pelger anomaly) caused by ganciclovir. *Transplantation*. 2005; 80(1): 127—30.

Поступила 19.08.13