

*Е.Е. Караманешт**И.С. Коренькова**С.В. Бородкин**В.Д. Дроздова**Г.С. Лобынцева**И.А. Вотякова**В.С. Говоров*

Украинская детская  
специализированная больница  
«ОХМАДЕТ» МЗ Украины,  
Киев, Украина

Киевский НИИ гематологии  
и трансфузиологии  
МЗ Украины, Киев, Украина

Центр технологий  
эмбриональных тканей  
«Эмбриотек», Киев, Украина

**Ключевые слова:** гемобластозы,  
стволовые клетки периферической  
крови, лейкаферез,  
колониестимулирующий фактор,  
восстановление гемопоэза.

## ВЫСОКОДОЗОВАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ У ДЕТЕЙ (ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ В УКРАИНЕ)

**Резюме.** Представлен первый опыт использования программ мегадозовой цитостатической терапии с трансплантацией клеток аутологичной гемопоэтической ткани у детей с гемобластозами. Материалом служил лейкоконцентрат стволовых клеток периферической крови (СКПК), который был получен на сепараторе, обработан и криоконсервирован в жидком азоте. Основным критерием качества материала служила оценка колониобразующей способности СКПК. У всех пациентов наблюдали полноценное приживление трансплантата с восстановлением гемопоэза после трансфузии размороженных СКПК. Подтверждена эффективность данного метода в качестве консолидирующей терапии при ряде онкогематологических заболеваний у детей.

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на некоторые успехи в лечении пациентов с онкогематологическими заболеваниями, прогноз для пациентов группы высокого риска или с рецидивирующим течением заболевания остается плохим. Нередко возникает проблема резистентности даже при лечении больных со злокачественными новообразованиями, чувствительными к цитостатическим препаратам. Повышение их дозы вызывает тяжелые токсические эффекты, угнетение системы кроветворения. Одним из путей преодоления индуцированной миелосупрессии является трансплантация клеток — предшественников гемопоэза, источником которых может быть костный мозг, или стволовых клеток периферической крови (СКПК) [1–3].

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С июля 1998 г. по май 1999 г. в отделении трансплантации костного мозга Украинской детской специализированной больницы «ОХМАТДЕТ» у 5 детей с гемобластозами были выполнены первые в Украине аутологичные трансплантации криоконсервированных СКПК.

В числе пациентов были: двое больных с лимфогранулематозом — ребенок в возрасте 4 лет с парциальной ремиссией после терапии раннего рецидива и подросток 14 лет в стадии полной ремиссии после «сальвадж-терапии» первично резистентной лимфомы Ходжкина; больной в стадии второй ремиссии острой миелоидной лейкемии после раннего рецидива; двое больных с неходжкинской злокачественной лимфомой (один с крупноклеточной анапластической лимфомой

Ki-1<sup>+</sup> в стадии второй ремиссии после раннего рецидива, другой — с беркиттоподобной лимфомой IV стадии при отсутствии полной ремиссии после окончания высокоинтенсивной полихимиотерапии по модифицированному протоколу NHL-BFM-95).

Мегадозовую химиотерапию и трансплантацию гемопоэтической ткани выполняли в целях улучшения результатов лечения пациентов с крайне отягощенным прогнозом при далеко зашедшей стадии заболевания [8, 9]. СКПК заготавливали с помощью сепаратора крови «COBE Spectra» (COBE Lab., Lakewood, CO, USA) по стандартной программе WBC — MNC 5.1 версии. Всего на сепараторе было выполнено 26 процедур лейкафереза для 9 больных, которых готовили к трансплантации гемопоэтической ткани (в среднем 2,89 из расчета на одного пациента). Возраст больных от 4 до 14 лет. Тринадцать процедур (50%) выполняли у детей с массой тела менее 25 кг [7]. Для мобилизации клеток — предшественников гемопоэза в зависимости от характера патологии и этапа терапии использовали различный подход, основанный на принципе получения фракции мононуклеарных лейкоцитов (MNC) на ранних стадиях восстановления гемопоэза после полихимиотерапии (ПХТ) на фоне стимуляции колониестимулирующим фактором. В 2 случаях применяли циклофосфамид (ЦФ) в дозе 4 г/м<sup>2</sup> с гликозилированным гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ) ленограстимом (Граноцит — «Беллон», Франция) в дозе 5 мкг/кг [5]. В одном случае мобилизацию выполняли с помощью только Г-КСФ. Целью было получение концентрата мононуклеаров из расчета не менее  $6 \cdot 10^8$  на 1 кг массы тела

пациента и гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ), определяемых при росте в культуре ткани, — не менее  $10 \cdot 10^4$  на 1 кг массы тела [4, 6, 9]. Оценку материала по экспрессии антигена CD34<sup>+</sup> не проводили. В среднем переработано  $8,68 \pm 0,76$  (4,25–16,03) л крови (3,49 объема циркулирующей крови — ОЦК на одного больного). Оценку качества материала проводили под микроскопом на основе учета количества МНС в каждой пробе и по количеству выросших КОЕ-ГМ на 1 кг массы тела пациента. Количество МНС в заготовленном продукте составляло от  $6,8 \cdot 10^8$  до  $14 \cdot 10^8$  на 1 кг массы тела пациента. В среднем для каждого больного было получено  $5,25 \pm 0,74 \cdot 10^5$  КОЕ-ГМ на 1 кг массы тела. Для процедуры лейкофереза использовали различные центральные и периферические вены (подключичную, бедренную, наружную и внутреннюю яремную). Заготовленный материал подвергали лабораторной обработке и криоконсервированию с помощью ДМСО в конечной концентрации 5% по оригинальной методике Центра технологий эмбриональных тканей «Эмбриотек» в программном замораживателе и сохраняли в жидкой фазе азота при температуре  $-196$  °С до трансплантации [10]. Жизнеспособность размороженных клеток оценивали с помощью культуральных исследований в полутвердой среде по количеству колоний и кластеров КОЕ-ГМ до и после криоконсервирования и по результатам окраски витальными красителями (трипановый синий). В нашем опыте количество жизнеспособных клеток, определенных с помощью культуральных методов, составляло 93–95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве высокодозовой полихимиотерапии использовали миелоаблативные режимы кондиционирования:

**BEAM** при лимфопролиферативных заболеваниях: кармустин в дозе 300 мг/м<sup>2</sup>, этопозид — 800 мг/м<sup>2</sup>, цитарабин — 800 мг/м<sup>2</sup>, мелфалан — 140 мг/м<sup>2</sup>;

**CVV** при рецидиве миелоидной лейкемии: бусульфан в дозе 16 мг/кг, этопозид — 40 мг/кг, циклофосфамид — 120 мг/кг.

Переносимость режима кондиционирования была удовлетворительной. Реинфузию СКПК проводили через 48 ч после окончания химиотерапии. Количественные характеристики размороженного лейкоконцентрата, использованного для реинфузии, были следующими: МНС —  $8,2 \cdot 10^8$  на 1 кг массы тела; КОЕ-ГМ —  $4,85 \pm 0,74 \cdot 10^5$  на 1 кг массы тела.

Лейкоконцентрат размораживали на водяной бане при температуре 40 °С непосредственно перед реинфузией и вводили в центральную вену. Для предупреждения нежелательных эффектов со стороны вегетативной нервной системы, обусловленных токсическим влиянием криопротектора (ДМСО), процедуру проводили под внутривенным наркозом. Количество нейтрофильных гранулоцитов более 500/мкл отмечено к 10–12-м суткам и только у 1 больной — к 20-м суткам, в среднем на 13-е сутки. Увеличение количества тромбоцитов более  $2 \cdot 10^4$ /мкл — к 14-м (10–16-м) суткам. У одной больной отмечено отсроченное восстановление элементов тромбоцитарного ростка. Органную токсичность при трансплантации

СКПК оценивали по шкале ВОЗ. Мукозит 3-й степени отмечен у 1 больного, гематологическая токсичность (4-й степени) — у 5; диарея (2-й степени) — у 1; повышение уровня билирубина — у 1; рвота, тошнота (3–4-й степени) — у 4; гипертермия (1-й степени) — у 2; стоматит (2–3-й степени) — у 2.

В стандартной сопроводительной терапии, начиная с 4–5-го дня после трансплантации, использовали рекомбинантный человеческий Г-КСФ — ленограстим в дозе 5 мкг/кг.

Системную антимикробную терапию назначали при температуре тела выше 38 °С, длительность фебрилитета в среднем составила 3,5 сут при средней продолжительности нейтропении в течение 13 сут. Антибиотикотерапия первой линии включала применение аминогликозида и цефалоспоринов III поколения. Смены антибиотиков не требовалось. Гемотрансфузию применяли у 3 больных (1, 2 и 4 соответственно), число трансфузий тромбоконцентрата составило в среднем 2,1 на одного больного. У больной с задержкой восстановления тромбоцитарного ростка потребовалось 8 трансфузий тромбоконцентрата. Парентеральное питание получали все пациенты в связи с тошнотой, многократной рвотой (2–4-й степени тяжести). Для профилактики грибковой инфекции с успехом использовали флуконазол, замена его амфотерицином была проведена лишь в одном случае. Профилактику веноокклюзионной болезни печени проводили с помощью низкомолекулярного гепарина (эноксапарин натрия) при условии поддержания уровня тромбоцитов выше  $2 \cdot 10^4$ /мкл.

Приживление трансплантата отмечено у всех пациентов. Констатировано восстановление клеток всех основных линий гемопоэза. Один больной с лимфогранулематозом и инициальным вовлечением в патологический процесс легких погиб на 38-е сутки вследствие респираторного дистресс-синдрома. Остальные пациенты были выписаны в удовлетворительном состоянии.

Ввиду малого количества наблюдавшихся больных, представленные данные, несомненно, следует рассматривать как предварительные. Однако они сопоставимы с результатами, полученными в зарубежных клиниках.

Данные литературы свидетельствуют о том, что достоверное повышение общей и безрецидивной выживаемости и, в частности, частоты ответа на ПХТ при лечении больных онкологического профиля, зависит от интенсивности используемых доз [11, 12]. Высокодозовая терапия сопровождается выраженной миелотоксичностью, для преодоления которой применяют трансплантацию клеток гемопоэтической ткани, заготовленных и криоконсервированных ранее. В качестве гемопоэтической ткани используют костный мозг или СКПК. Аутологичная пересадка СКПК после проведения миелоаблативных курсов химиотерапии характеризуется высоким процентом приживления трансплантата и коротким периодом нейтропении, что позволяет рассматривать ее как метод выбора в терапии больных с крайне злокачественными формами опухолей, а также онкогематологических и лимфолиферативных заболеваний. Обязательным условием, обеспечивающим успешное и быстрое восстановление кроветворе-

ния после химиотерапии в сверхлетальных дозах, является полноценность трансплантируемого клеточного материала. Как показал наш опыт, при использовании метода высокоскоростного лейкофереза большого объема крови на сепараторе COBE Spectra достаточно 1–2 процедур для получения полноценной дозы гемопоэтических клеток-предшественников, обеспечивающих восстановление кроветворения. Возможности сепаратора позволяют применять различный венозный доступ для выполнения процедуры. Для оптимизации процесса предпочтительно использовать надежный укороченный центральный катетер достаточного диаметра как для забора, так и для возврата сепарируемой крови, например двухпросветный диализный катетер. Переносимость пациентами процедуры лейкофереза удовлетворительная, без клинически значимых изменений гемодинамики. Процедура при адекватном мониторинге безопасна у детей с массой тела менее 25 кг. В большинстве случаев приживление трансплантата происходит в течение 3 нед, это определяет длительность цитопении, вероятность фебрильной нейтропении, высокий риск инфекционных (бактериальных, грибковых, вирусных) осложнений, кратность заместительных трансфузий компонентов крови. Использование СКПК позволяет сократить время, необходимое для восстановления гемопоэза, и как следствие — снизить вероятность развития тяжелых угрожающих жизни инфекционных осложнений, а следовательно, и уменьшить стоимость лечения.

Возникновение рецидивов, по данным литературы, является одной из основных причин смерти больных после высокодозовой полихимиотерапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических клеток [13]. Для повышения эффективности метода отбор больных для высокодозовой ПХТ с трансплантацией СКПК следует вести с учетом стадии заболевания, химиочувствительности опухоли, количества ранее проведенных курсов ПХТ, исходного состояния больного. Выполнение аутоотрансплантации костного мозга и аутоотрансплантации СКПК в далеко зашедших стадиях болезни предполагает дополнительные мероприятия, такие, как «очистка» аутоотрансплантата *in vivo* и *in vitro* (позитивная и негативная клеточная селекция), накопление клеточной массы в ростовой среде, адоптивная иммунотерапия, использование более совершенных кондиционирующих режимов.

Развитие метода аутоотрансплантации гемопоэтической ткани с использованием современных иммунологических и культуральных методик оценки качества материала будет более успешным только при условии целевого финансирования.

Авторы выражают благодарность проф. Д.Ф. Глузману (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины) за выполнение иммуноцитохимических и цитологических исследований, а также ст. науч. сотр. А.И. Коваль (Институт гематологии МЗ Украины) за морфологические исследования трепанобиоптатов костного мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Frei E.** Pharmacologic strategies for high-dose chemotherapy. In: Armitage J, Antman K, eds. High-dose Cancer Therapy.

Pharmacology, Hematopoietins. Stem Cells. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992: 3–13.

2. **Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Hass R.** Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF. *Exp Hematol* 1993; **21**: 508–14.

3. **Schwartzberg L, Birch R, Blanco R, et al.** Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1993; **11**: 369–74.

4. **Beyer J, Schwella N, Zingsem J, et al.** Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1328–35.

5. **Duhrsen U, Villeval J-L, Boyd J, Kannourakis G.** Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; **72**: 2074–81.

6. **Inwards D, Kessinger A.** Peripheral blood stem cell transplantation: historical perspective, current status, and prospects for the future. *Trans Med Rev* 1992; **4**: 183–90.

7. **Lasky L, Fox S, Smith J, Bostrom B.** Collection and use of peripheral blood stem cells in very small children. *Bone Marrow Transplant* 1991; **7**: 281–4.

8. **Haas R, Mole R, Fruhauf S, et al.** Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; **83**: 3787–94.

9. **Demirer T, Petersen FB, Bensinger WI, et al.** Autologous transplantation with peripheral blood stem cells collected after G-CSF in patient with acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; **18**: 29–34.

10. **Gorin NC.** Cryopreservation and storage of stem cell. In: Areman E, Deeg HJ, Sacher RA, eds. *Bone Marrow and Stem Cell Processing. A Manual of Current Techniques*. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1992: 292–308.

11. **Frei E, Canellios GP.** Dose, a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1980; **69**: 585–94.

12. **Linch DC, Winfield D, Golstone AH, et al.** Dose intensification with autologous bone marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkins disease: results of BNLI randomized trial. *Lancet* 1993; **341**: 1051–5.

13. **Gorin NC.** Autologous stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia. *Blood* 1998; **92**: 1073–90.

## THE HIGH-DOSE CYTOSTATIC THERAPY AND TRANSPLANTATION OF CRYOPRESERVED AUTOLOGOUS PERIPHERAL BLOOD STEM CELLS IN TREATMENT OF HEMOBLASTOSES IN CHILDREN (THE FIRST EXPERIENCE IN UKRAINE)

*E.E. Karamanesh, I.S. Korenkova, S.V. Borodkin, V.D. Drozdova, G.S. Lobintseva, I.A. Votyakova, V.S. Govorov*

**Summary.** *The first experience in employing high-dose cytostatic therapy and autologous peripheral blood stem cells (PBSC) transplantation in the treatment of childhood hematoblastoses in Ukraine has been considered. PBSC were collected by the continuous flow cell separator, processed and cryopreserved in liquid nitrogen. The quality of PBSC was assessed before transplantation by the colony formation ability. Reconstitution of hematopoiesis after transplantation of defreezed PBSC was achieved in all patients. The method was effective as consolidating therapy modality employed after salvage protocols at the advanced stages of several childhood hemoblastoses*

**Key Words:** hemoblastoses, PBSC, leukopheresis, CSF, hemopoiesis recovery.