А.Ю. ПОПОВ,
Н.В. ЖУКОВ,
С.В МИНЕНКО,
Е.П. ГРИШУНЕНКОВА,
Л.Ю. АНДРЕЕВА,
В.В. ПТУШКИН,
РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН,
Федеральный научный центр детской гематологии, онкологии, иммунологии, Москва

Применение препарата Лейкостим® для мобилизации и сбора гемопоэтических стволовых клеток

Важнейшим фактором, регулирующим образование функционально активных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга, является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), продуцируемый макрофагами, фибробластами и нейтрофилами. Г-КСФ – гликопротеин с молекулярной массой 18-22 кД, который, взаимодействуя с рецепторами на наружной мембране гемопоэтических клеток гранулоцитарного ростка кроветворения, стимулирует их пролиферацию. Он также регулирует некоторые функции зрелых нейтрофилов, включая хемотаксис, миграцию и образование супероксида.

Создание рекомбинантных препаратов Г-КСФ позволило активно использовать их для коррекции иммунодефицитных состояний, обусловленных недостаточной продукцией гранулоцитов. Применение препаратов Г-КСФ для профилактики инфекционных осложнений у онкологических больных и ВИЧ-инфицированных пациентов позволяет уменьшать выраженность нейтропении после применения цитостатиков или противовирусных препаратов (3). Кроме того Г-КСФ способствует миграции кроветворных клеток из костного мозга в периферическую кровь. Это позволяет выделять кроветворные клетки из крови, не прибегая к эксфузии костного мозга, что сокращает риск осложнений. Почти 15 лет Г-КСФ является одним из наиболее распространенных ростовых факторов, используемых в трансплантологии для мобилизации клеток-предшественников гемопоэза (CD34+ клеток) (4,5).

Целью нашего исследования была оценка эффективности использования препарата Лейкостим® (филграстим) для мобилизации КПГ.

Применение препаратов Г-КСФ для профилактики инфекционных осложнений у онкологических больных и ВИЧ-инфицированных пациентов позволяет уменьшать выраженность нейтропении после применения цитостатиков или противовирусных препаратов. Кроме того Г-КСФ способствует миграции кроветворных клеток из костного мозга в периферическую кровь. Это позволяет выделять кроветворные клетки из крови, не прибегая к эксфузии костного мозга, что сокращает риск осложнений.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Определение эффективности препарата, назначаемого в стандартной рекомендуемой дозе.
2. Сравнение полученных результатов с данными о применении оригинального препарата Г-КСФ Нейпоген (группа исторического контроля).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее исследование было включено 10 пациентов с солидными и гематологическими новообразованиями, которым на данном этапе лечения планировалось проведение высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных КПГ. Средний возраст больных составил 32,9 года (от 18 до 55 лет). Среди этих больных было 2 женщины (20%) и 8 мужчин (80%). Распределение пациентов по нозологиям представлено в таблице 1.

С целью мобилизации и сбора CD34+ клеток периферической крови все пациенты получали подкожно Лейкостим®. Девяти пациентам Лейкостим® назначался после проведения миелосупрессивной химиотерапии. Введение препарата в дозе 5 мкг/кг в сутки начиналось на пятые сутки после последнего введения цитостатиков (рисунок 1).

Использовавшиеся режимы химиотерапии представлены в таблице 2.

При восстановлении гемопоэза после прохождения точки максимального падения содер-

жания лейкоцитов (надира) и достижения уровня лейкоцитов более 3x10^9/л мониторировался уровень CD34+ клеток в периферической крови, отражающий содержание КПГ. Сбор КПГ начинался в случае наличия одного из ниже перечисленных условий:

- содержание CD34+ клеток более 10 в 1 мкл периферической крови;
- содержание CD34+ клеток в периферической крови менее 10, но более 5 в 1 мкл на протяжении двух и более дней на фоне продолжающейся стимуляции и роста уровня лейкоцитов.

Сбор проводился ежедневно на фоне продолжающейся стимуляции до получения количества гемопоэтического материала, необходимого для быстрого восстановления кроветворения после проведения высокодозной химиотерапии (не менее 2x10^6/кг CD34+ клеток на каждую планируемую трансплантацию). Перед каждой процедурой сбора у пациентов, имевших накануне содержание CD34+ клеток в периферической крови менее 5 в мкл, осуществлялось повторное их определение в крови. В случае снижения их уровня стимуляция и сбор прекращались досрочно.

У одного пациента Лейкостим® использовался в фазе стабильного кроветворения (вне периода индуцированной химиотерапией миелосупрессии). Препарат вводился в дозе 10 мкг/кг в сутки (рисунок 2). Этому пациенту стимуляция проводилась после неудачной первой попытки стимуляции и сбора КПГ препаратом Нейпоген.

На 7 день стимуляция была досрочно остановлена в связи с крайне низкой ее результативностью (количество CD34+ клеток в 1 мкл крови менее 1).

ПРОЦЕДУРА СБОРА КЛЕТОК – ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА

Перед началом сбора осуществлялась катетеризация

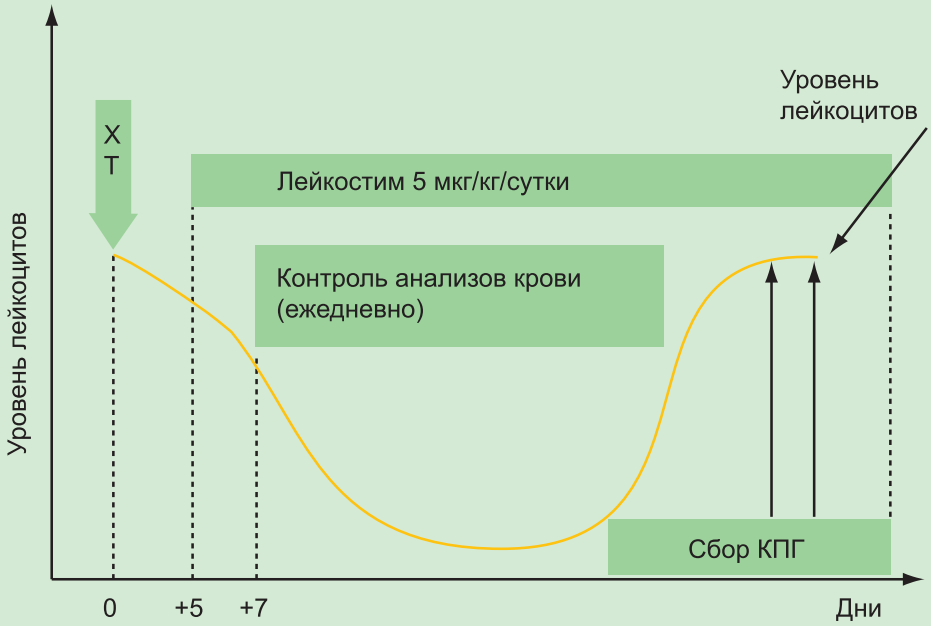

Рисунок 1. Схема мобилизации КПГ после миелосупрессивной химиотерапии

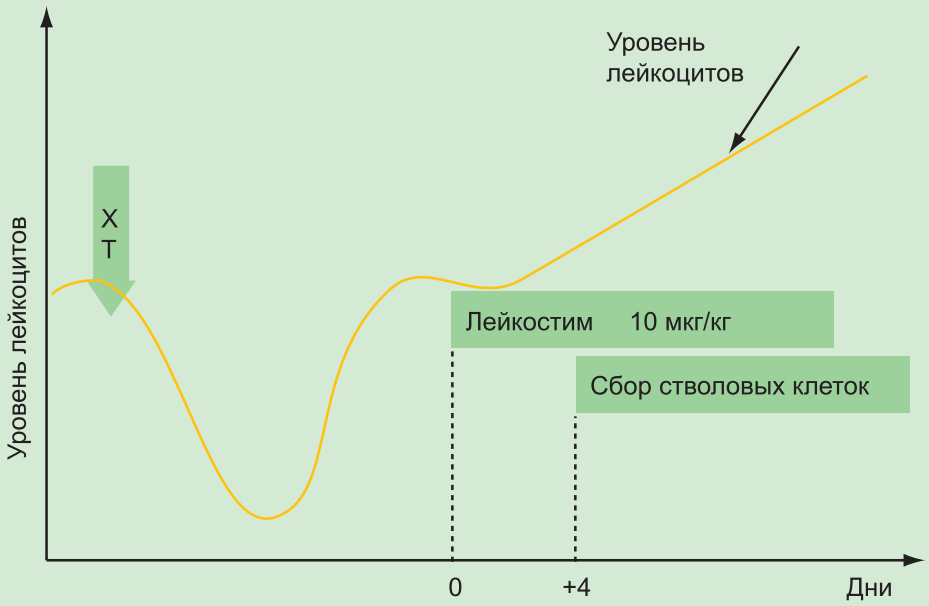

Рисунок 2. Схема мобилизации КПГ в фазе стабильного кроветворения

Таблица 1. Диагнозы пациентов, включенных в исследование

Диагноз	Число больных (n=10)
Лимфома Ходжкина	3
Неходжкинские лимфомы	3
Опухоли семейства саркомы Юинга	2
Миеломная болезнь	2

Таблица 2. Результаты мобилизации КПГ после миелосупрессивной химиотерапии

Пациенты	Количество лейкоцитов периферической крови (тыс. в мкл) на момент сбора КПГ	% / абсолютное число CD34+ клеток в периферической крови (в мкл) на момент сбора КПГ	Курс индукционной химиотерапии
1	18,6	0,05/9	IGEV
2	19,1	0,03/6	CTX
3	12,01	0,05/6	Dexa-BEAM
4	6,7	0,47/31	CTX
5	42	0,06/25	Dexa-BEAM
6	30	0,04/12	ICE
7	7,6	0,07/5	ACOP
8	20	0,05/10	ICE
9	8	0,07/5	Dexa-BEAM

Таблица 3. Результаты сбора КПГ после миелосупрессивной химиотерапии

Пациенты	Количество CD34+ за 1 процедуру сбора/кг массы тела пациента	Количество CD34+ за 2 процедуры сбора/кг массы тела пациента	Количество CD34+ за 3 процедуры сбора/кг массы тела пациента	Суммарное количество CD34+ клеток /кг массы тела пациента
1	0,61	0,6		1,21
2	0,9	5,2		7,02
3	0,12	0,48		0,67
4	2,4	3,29	1,02	6,8
5	0,36	1,64		2,0
6	2,14	1,09		3,24
7	0,03	0,03	0,1	0,17
8	1,4	1,2	1,0	3,6
9	1,5	1,2		2,7

центральной вены (подключичная, внутренняя яремная или бедренная вена). Катетеризация осуществлялась по методу Сельдингера под местной анестезией. Использовался двухпросветный катетер, обеспечивающий скорость потока крови не менее 50 мл/минуту. Процедура сбора осуществлялась с использованием сепараторов клеток крови фирмы Baxter (CS 3000 Plus или Amicus) (6).

При использовании сепаратора CS 3000 Plus обработке подвергалось 8-12 литров крови пациента, в зависимости от скорости расхода антикоагулянта из штатной системы сепаратора. Поддерживалось соотношение цитрат/кровь 1:10 – 1:11. Для сбора использовались стандартные программы сбора КПГ Special-1 или Special-2. Скорость потока крови составляла от 50 до 60 мл/мин., в зависимости от пропускной способности венозного доступа.

При использовании сепаратора крови Amicus объем обрабатываемой крови также зависел от скорости расхода антикоагулянта из штатной системы, и составлял от 12 до 15 литров. Скорость потока зависела от максимально допустимой скорости инфузии цитрата, автоматически определяемой аппаратом исходя из массы тела пациента.

В период процедуры сепарации пациент находился под наблюдением врача. Регистрировались побочные явления, при необходимости проводились лечебные мероприятия для их купирования.

После окончания процедуры из полученного материала в асептических условиях забирались пробы для анализа на содержание ядросодержащих клеток и CD34+ клеток.

Разработка методов мобилизации КПГ из костного мозга в периферическую кровь с помощью Г-КСФ позволила получать КПГ в большем количестве и быстрее восстанавливать кроветворение, снижая риск инфекционных и геморрагических осложнений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ CD34+ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Определение содержания КПГ в периферической крови и продукте сепарации осуществлялось методом проточной цитометрии (7). Подсчет клеток, несущих на мембране антиген CD34, проводился на цитометре FACScan (Becton Dickinson, USA).

Введение Лейкостима® у пациентов после цитостатической терапии (n=9) позволило начать сбор КПГ у всех пациентов в сроки от 4 до 10 дней от начала стимуляции, в среднем на 6-й день. Уровень лейкоцитов в периферической крови колебался от 6,7 до 42 тысяч в микролитре (в среднем 18,2 тысячи в микролитре). Процент CD34+ клеток в периферической крови колебался от 0,03%

ЛЕЙКОСТИМ®

Вместе надежнее!

Биокад

филграстим

ПЕРВЫЙ РОССИЙСКИЙ Г-КСФ

Подтвержденная высокая гемопоэтическая эффективность

Низкий уровень костно-мышечных болей

Разработка российских ученых

Производство по стандартам GMP

Удобство дозирования: 150 мкг, 300 мкг и 480 мкг

Горячая линия: ***8 800 200 08 16***

www. leucostim.ru

Регистрационный № ЛС-002011 от 15.09.2006

В последние годы во всем мире высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных КПГ является предпочтительным методом лечения пациентов с неблагоприятным вариантом течения многих злокачественных лимфом и реже – солидных опухолей. Принципиальным для проведения данного метода лечения является получение клеток – предшественников кроветворения, позволяющих восстановить гемопоэз после агрессивной цитостатической терапии.

до 0,47% (в среднем 0,09%). Абсолютное число CD34+ клеток в микролитре варьировало от 5 до 31 (в среднем 12,1 в микролитре) (таблицы 2, 3).

Пациентам этой группы было проведено от 2 до 3 сепараций. У 6 пациентов процедуры по сбору КПГ были прекращены в связи с получением достаточного количества гемопоэтического материала (от 2 до 7×10^6/кг CD34+ клеток), у 3 пациентов – в связи с отсутствием дальнейшего повышения уровня CD34+ клеток в периферической крови.

У пациента, которому проводилась повторная стимуляция после неудачной стимуляции Нейпогеном, введение Лейкостима® в течение 7 дней не привело к достаточному выбросу CD34+ клеток в кровь. Процент CD34+ клеток в периферической крови не повышался более 0,01%. В связи с этим дальнейшая стимуляция была признана нецелесообразной, и введение Лейкостима® было прекращено.

Таким образом, запланированное количество КПГ получено у 60% больных. По нашим данным, применение других препаратов Г-КСФ (Нейпоген, Граноцит) в аналогичной группе пациентов позволяет добиться успеха у 56,6% пациентов, что сопоставимо с результатами, полученными при применении Лейкостима®, хотя и в ограниченном по объему исследовании.

В процессе применения препарата не было выявлено каких-либо серьезных побочных эффектов. Трое пациентов отметили неприятные ощущения (покалывания) в области подкожных инъекций Лейкостима®, продолжавшиеся 15-20 минут после введения. Изменений биохимических параметров крови не отмечено.

Из вышесказанного можно сделать следующие выводы:

- Лейкостим® является эффективным препаратом для мобилизации и сбора клеток – предшественников гемопоэза у онкологических больных;
- отмечена хорошая переносимость препарата Лейкостим®.

В последние годы во всем мире высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных КПГ является предпочтительным методом лечения пациентов с неблагоприятным вариантом течения многих злокачественных лимфом и реже – солидных опухолей (8). Принципиальным для проведения данного метода лечения является получение клеток – предшественников кроветворения, позволяющих восстановить гемопоэз после агрессивной цитостатической терапии. Долгие годы эти клетки получали путем эксфузии костного мозга, однако данный метод не является оптимальным ввиду его травматичности, необходимости общего наркоза и малой эффективности при предшествующем облучении тазовой области. Разработка методов мобилизации КПГ из костного мозга в периферическую кровь с помощью Г-КСФ (9) позволила получать КПГ в большем количестве и быстрее восстанавливать кроветворение, снижая риск инфекционных и геморрагических осложнений (10). До последнего времени в нашей стране с этой целью использовались рекомбинантные Г-КСФ зарубежного производства. В настоящее время разработан отечественный препарат человеческого рекомбинантного Г-КСФ Лейкостим® (филграстим). Препарат является аналогом препарата Нейпоген (филграстим) (F.Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария). Как показало наше небольшое исследование, российский аналог обладает сопоставимой эффективностью и низкой токсичностью.

Список литературы:

1. Metcalf D, Nicola NA: The Hematopoietic Colony-Stimulating Factor, in From Biology to Clinical Applications. Cambridge University Press. Cambridge, 1995, pp 44-55.
2. Sieff CA, Emerson SG, Wang EA, et al: Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: A multilineage hematopoietin. Science 230:1117-1174, 1985.
3. Garavelli PL, Berti P: Efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in the long-term treatment of AIDS-related neutropenia. AIDS 7:589-590, 1993.
4. Barr R.D., Whang-Peng J., Perry S., Hemopoietic stem cells in peripheral blood. Science 1975, 90, 284-285).
5. Andrews R.G., Singer J. W.- Precursors of colony-forming cells in human can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigen and light scatter proportion.-J.Exp. Med.-1989-V.169-p.1721-1726.
6. Птушкин В.В., Селидовкин Г.Д. Методические аспекты получения гемопоэтического трансплантационного материала из костного мозга и периферической крови. Трансплантология и искусственные органы,1995, №4, 34-40.
7. Bender G., Unverzag L., Walker D. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolour flow cytometry.- Blood-1991.-V.77 (12)-p.2591-2596.
8. Kissinger A., Armitage J.O. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high dose therapy for malignancies. Blood 1991, 211-213.
9. Socinski M.A., Cannistra S.A., Elias A., Antman K.H., Schnipper L., Griffin G.D.- Cranulocyte-macrophage colony-stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cells compartment in man.- Lancet.-1988.-V. 1.-p.1194-1199.
10. Smith TJ; Hillner BE; Schmitz N; et al. Economic analysis of a randomized clinical trial to compare filgrastim- mobilized peripheral-blood progenitor-cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. JCO 15/1 (5-10) 1997.