

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОБИЛИЗАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПРЕПАРАТА ЛЕЙКОСТИМ У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Л.С. Зубаровская¹, Е.В. Семенова¹, Е.В. Бабенко¹, А.А. Головачева¹, Б.В. Афанасьев¹, В.Б. Ларионова², К.Н. Мелкова², О.А. Рукавицын³, С.В. Шаманский³, В.Г. Савченко⁴, Л.П. Менделеева⁴, Н.Г. Тюрина⁵, И.А. Лисуков⁶, Т.С. Константинова⁷, В.В. Птушкин⁸, Р.А. Иванов⁹, А.В. Солодахин⁹

¹Институт детской гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой СПбГМУ; ²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; ³ФНКЦ «Детской гематологии, онкологии и иммунологии» Росздрава, Москва; ⁴Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко Минобороны России, Москва; ⁵Гематологический научный центр РАМН, Москва; ⁶Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва; ⁷НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск;

⁸Областной гематологический центр Свердловской областной клинической больницы, Екатеринбург;

⁹ЗАО «Биокад», Московская область

Создание препаратов рекомбинантных белков, в норме являющихся эндогенными факторами-регуляторами кроветворения, качественно повысило возможности терапии больных злокачественными заболеваниями и депрессиями кроветворения. Из них наиболее широко в клиническую практику внедрены естественные стимуляторы эритропоэза (эритропоэтин) и грануломоноцитопоэза (колониестимулирующие факторы — КСФ: гранулоцитарный — Г-КСФ и гранулоцитарно-макрофагальный).

Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) связано с его влиянием на клетки-предшественники грануломоноцитопоэза: стимуляцией их конечной дифференцировки в зрелые формы и выхода в кровь. Наряду с этим введение Г-КСФ как здоровым лицам, так и пациентам, повышает уровень гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в крови. Основным маркером этого клеточного пула является антиген CD34. Механизм мобилизации CD34+ клеток с помощью Г-КСФ реализуется на фоне повышенной секреции нейтрофилами протеаз, включая эластазу, катепсин-G, а также металлопротеиназы-9 (MMP-9). При мобилизации отмечается снижение экспрессии рецепторов c-Kit, VLA-4 и CXCR4 на CD34+-клетках, что в сочетании с изменением экспрессии молекул адгезии, в первую очередь VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), VLA-1 (very late antigen), а также SDF-1 (stromal derived factor) на клетках стромы костного мозга, приводит к выходу CD34+-клеток в кровь [1–3].

Особенности действия Г-КСФ определяют показания к его назначению: укорочение периода цитопении после проведения химиотерапии, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК); синхронизация клеточного цикла при

назначении цитостатиков; мобилизация ГСК в кровь перед выполнением аппаратного цитафереза для заготовки трансплантата от аллогенного донора/аутодонора [4].

В качестве лекарственного препарата Г-КСФ выпускается в виде двух форм — гликозилированной (ленограстим) и негликозилированной (филграстим). Отечественный рекомбинантный препарат Г-КСФ Лейкостим (МНН: филграстим; производитель — ЗАО «БИОКАД», Россия) является полным аналогом Нейпогена (производитель — F. Hoffman-La Roche, Швейцария), что подтверждено данными доклинических испытаний, показавших идентичность физико-химических свойств, специфической активности, фармакокинетики и токсикологических характеристик. Клиническая эффективность и безопасность Лейкостима были подтверждены в ходе открытого нерандомизированного клинического исследования [5].

Целью настоящего исследования явилась оценка мобилизующей активности отечественного рекомбинантного Г-КСФ Лейкостим при выделении периферических стволовых клеток крови (ПСКК), изучение качественных характеристик трансплантата, побочных реакций, связанных с введением препарата, особенностей восстановления кроветворения при проведении аутологичной трансплантации ГСК (ауто-ТГСК), выделенных с помощью Лейкостима у пациентов со злокачественными заболеваниями.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие следующие лечебные учреждения: отделение химиотерапии гемобластозов и отделение трансплантации костного мозга, интенсивной терапии и реанимации РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Гематологический центр Главного военного госпиталя

им.Н.Н. Бурденко, клиника ТКМ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, отделение химиотерапии гемобластозов и ТКМ ГНЦ РАМН, отделение высокодозной химиотерапии и трансплантации кроветворных стволовых клеток МНИОИ им.П.А. Герцена (руководитель — д.м.н. Н.Г. Тюрина), НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Областной гематологический центр Свердловской областной клинической больницы.

Под наблюдением находилось 42 человека с различными онкологическими заболеваниями. У 15 из них мобилизация ПСКК проводилась на стимулированном кроветворении (Лейкостим вводился менее чем через неделю после применения химиотерапевтических препаратов). В итоговый анализ включено 27 человек в возрасте от 20 до 60 лет (медиана — 27 лет), у которых мобилизация проводилась на стабильном кроветворении (Лейкостим вводился не ранее, чем через месяц после окончания курса химиотерапии). По диагнозам пациенты распределились следующим образом: лимфома Ходжкина (ЛХ) — 9, неходжкинские лимфомы (НХЛ) — 9, множественная миелома (ММ) — 5, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) — 2, нейроэктодермальная опухоль — 1, саркома Юинга — 1. До назначения Лейкостима пациенты суммарно получили от 2 до 20 курсов химиотерапии (медиана — 7,57) (рис.1).

В соответствии с критериями включения в исследование в течение 6 мес. до назначения препарата пациентам проводилось не более 3 курсов химиотерапии.

Мобилизацию ПСКК осуществляли путем назначения Лейкостима в дозе 10 мкг/кг/день, в режиме 1 или 2 подкожные инъекции в течение 5—7 дней последовательно. Стимулирующий эффект препарата оценивали путем ежедневного контроля уровня лейкоцитов в периферической крови. Цитаферез проводили при увеличении числа лейкоцитов более $10,0 \times 10^9/\text{л}$, начиная с 4-го дня введения Лейкостима, общее количество сепараций колебалось от 1 до 4, что зависело от качественных характеристик полученного продукта.

После каждого цитафереза подсчитывали количество ядросодержащих клеток, мононуклеаров и CD34+-клеток в образце, предназначенном для криоконсервации. При недостаточном для ауто-ТГСК

количестве CD34+-клеток в продуктах цитафереза дополнительно выполняли аутоэкспузию костного мозга.

Динамическое наблюдение за пациентами осуществляли по следующим параметрам: артериальное давление, температура тела, изменение показателей анализа периферической крови и биохимических показателей, нежелательные явления, связанные с применением препарата. У 4 пациентов выполнена оценка количества в трансплантате колониеобразующих единиц клеток-предшественников грануло-моноцитопозеза (КОЕ-ГМ) (методом культивирования в полужидких средах, содержащих ростовые факторы), у 5 пациентов жизнеспособность CD34+ клеток подтверждена с помощью определения активности альдегиддегидрогеназы (ALDH+- клетки).

Результаты

По результатам исследования установлено, что препарат Лейкостим обладает мобилизующей активностью и эффективен при назначении пациентам с онкологическими и гематологическими заболеваниями с целью получения ПСКК для последующей аутологичной трансплантации. Увеличение количества нейтрофилов при введении Лейкостима достигало значения, необходимого для выполнения цитафереза, в среднем к 4-му дню и сохранялось на этом уровне до 7-го дня исследования (рис. 2).

Из 42 пациентов, исходно включенных в исследование, у 29 (71%) минимально необходимое для аутотрансплантации количество CD34+-клеток ($2,0 \times 10^6/\text{кг}$ веса пациента) было отобрано

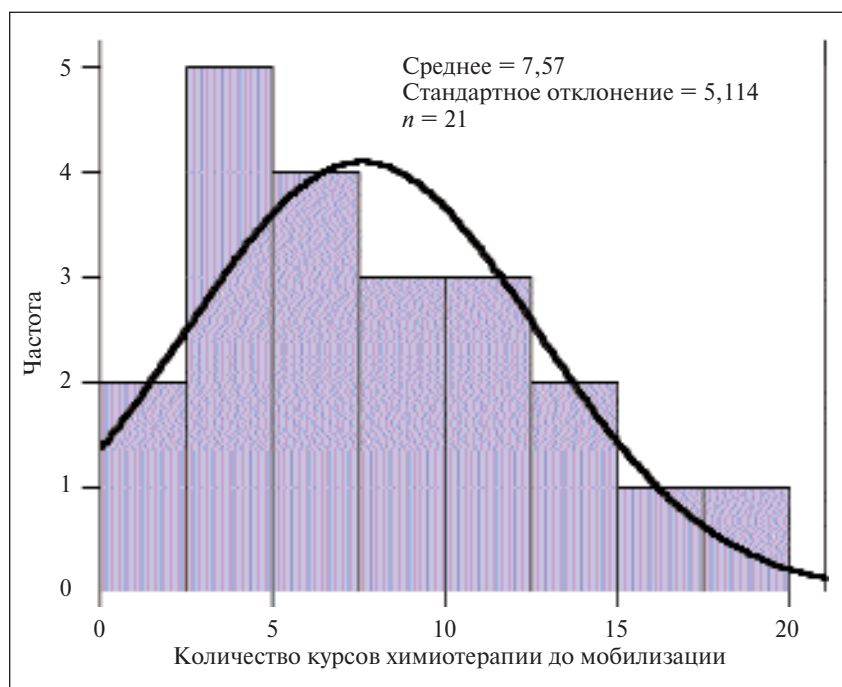


Рис.1. Количество курсов химиотерапии до назначения Лейкостима с целью мобилизации ПСКК

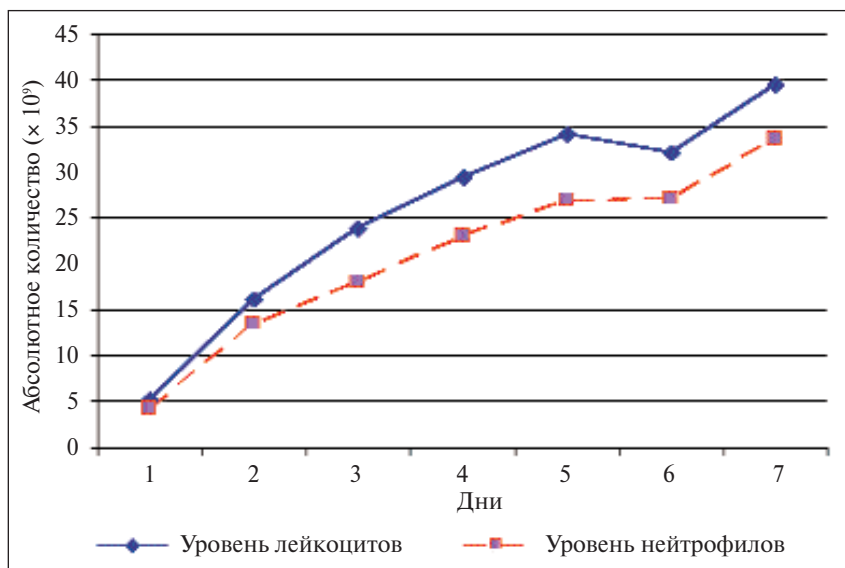


Рис. 2 Динамика увеличения общего количества лейкоцитов и нейтрофилов в анализе крови при стимуляции аутореципиентов с помощью Лейкостима.

за 1—5 сеансов цитафереза. Дополнительная аутоэкспузия костного мозга была проведена 13 пациентам (у 1 пациента мобилизация не была оценена должным образом ввиду неисправности сепаратора). Группа из 15 пациентов, получавших Лейкостим для мобилизации на стимулированном кроветворении, характеризовалась высокой эффективностью мобилизации: у 87% больных необходимое количество CD34+-клеток было отобрано за 1—5 сеансов цитафереза. Однако ввиду значительной гетерогенности данной группы больных, связанной с различиями в протоколах химиотерапии, в дальнейший анализ были включены 27 пациентов, получавших Лейкостим для мобилизации на стабильном кроветворении.

Возраст больных и характер заболевания не оказывали влияния на эффективность мобилизации CD34+-клеток, за исключением более низ-

соответственно. При оценке количества CD34+-клеток максимальная мобилизующая активность Лейкостима наблюдалась у пациентов, получивших до 3 курсов химиотерапии. У этих пациентов содержание CD34+-клеток в трансплантате составило $7,66 \times 10^6$ / кг веса пациента ($1,58 - 30,8 \times 10^6$ / кг). При количестве курсов химиотерапии от 4 до 10 и более 10 этот показатель был равен $3,63 \times 10^6$ /кг веса пациента ($0,61 - 10,5 \times 10^6$ / кг) и $2,2 \times 10^6$ /кг веса пациента ($0,76 - 4,07 \times 10^6$ /кг) соответственно (табл. 2).

Образцы, подвергшиеся культивированию, содержали КОЕ-ГМ в количестве $15,9 \times 10^4$ /кг веса пациента, ALDH+-клетки — в количестве $3,16 \times 10^4$ / кг веса пациента.

Побочные эффекты, связанные с назначением Лейкостима, наблюдали у 14 пациентов (52%). Они выражались представлены следующими реакциями: боль в костях, повышение температуры тела, развитие гриппоподобного синдрома. Ни у одного пациента интенсивность побочных реакций не превышала 2-й степени токсичности и не потребовала прерывания курса введения препарата.

Полученные клетки были подвергнуты криоконсервации и использованы в последующем при проведении ауто-ТГСК у 21 пациента со следующими диагнозами: ЛХ — 8 больных, НХЛ — 6, ММ — 4, ОЛЛ — 2, саркома Юинга — 1 больной. Основными режимами кондиционирования при ЛХ, НХЛ и ММ были BEAM и высокие

Таблица 1. Количество ядросодержащих и CD34+-клеток в трансплантате в зависимости от возраста и диагноза пациента

Параметры сравнения	Ядросодержащие клетки в трансплантате ($\times 10^9$ /л)	CD34+-клетки в трансплантате ($\times 10^6$ /кг веса пациента)
Всего (n=27)	63,4 (11,7—184,49)	4,9 (0,5—30,8)
Возраст:		
до 40 лет (n=19)	63,2 (11,7—184,49)	3,44 (0,5—23,7)
40 лет и старше (n=8)	63,8 (23,0—98,2)	5,4 (0,95—11,97)
Диагноз:		
лимфома Ходжкина (n=9)	60,86 (20,9—123,6)	1,69 (0,5—2,35)
Неходжкинские лимфомы (n=9)	71,39 (11,7—184,49)	6,27 (0,82—23,7)
Множественная миелома (n=5)	58,66 (23,0—85,7)	5,71 (3,2—7,36)
ОЛЛ (n=2)	67,7 (34,4—10)	1,28 (0,61—1,95)
Нейроэктодермальная опухоль (n=1)	47,5	2,37
Саркома Юинга (n=1)	45,1	3,23

ЛЕЙКОСТИМ®

Вместе надежнее!



филграстим

Биокаг

ПЕРВЫЙ РОССИЙСКИЙ Г-КСФ

- Подтвержденная высокая гемопозитическая эффективность
- Низкий уровень костно-мышечных болей
- Разработка российских ученых
- Производство по стандартам GMP
- Удобство дозирования:
150 мкг, 300 мкг, 480 мкг



Таблица 2. Эффективность мобилизации ПСКК Лейкостимом в зависимости от количества курсов предшествующей химиотерапии

Параметры сравнения	Количество курсов химиотерапии		
	< 3 (n=7)	3-10 (n=9)	> 10 (n=5)
Длительность стимуляции, дни	4,5—6,5	3,0—6,5	2,5—7,0
Количество цитаферезов	2—3	1—4	2—4
Количество ядросодержащих клеток в трансплантате ($\times 10^9/\text{л}$)	51,62 (23,0—71,7)	69,84 (34,4—184,49)	39,6 (31,2—74,7)
Количество CD34+/кг веса пациента в момент цитафереза ($\times 10^6/\text{л}$)	7,66 (1,58—30,8)	3,63 (0,61—10,5)	2,2 (0,76—4,07)
Количество CD34+/кг веса пациента в момент трансплантации ($\times 10^6/\text{л}$)	8,5 (1,58—30,8)	3,92 (0,61—10,5)	2,2 (0,76—4,07)

дозы мелфалана. Среднее количество введенных CD34+-клеток составило $2,98 \times 10^6/\text{кг}$ веса пациента (0,76—11,97). Приживление трансплантата на основании определения уровня нейтрофилов более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ в крови достигнуто у пациентов в среднем к 12-му дню (в пределах 8—17 дней), по уровню тромбоцитов более $20,0 \times 10^9/\text{л}$ крови — к 15-му дню (в пределах 10—30 дней) после ауто-ТГСК (табл.3).

У одного пациента с ОЛЛ наблюдали отторжение трансплантата, связанное с основным заболеванием.

Осложнения после ауто-ТГСК были следующие: инфекционные состояния (13 пациентов), представленные фебрильной нетропией (9 пациентов, у одного из них в последующем имело место развитие пневмонии), сепсис (1 больной), поверхностный кандидоз (1 пациент), герпетическая инфекция (1 пациент); и геморрагические проявления (15 пациентов) (табл. 4).

Таблица 3. Сроки восстановления нейтрофилов и тромбоцитов после ауто-ТГСК

Параметры сравнения	Результаты
Количество CD34+ ($\times 10^6/\text{кг}$ веса пациента)	2,98 (0,76—11,97)
Восстановление нейтрофилов $> 0,5 \times 10^9/\text{кг}$ (день)	12,61 (8—17)
Восстановление тромбоцитов $> 20 \times 10^9/\text{кг}$ (день)	15,5 (10—30)

Таблица 4. Осложнения после ауто-ТГСК

Осложнения после аутоТГСК (n=21)	n (%)
Инфекционные:	13 (61,9%)
фебрильная нейтропения	6 (28,4%)
фебрильная нейтропения + мукозит	1 (4,8%)
фебрильная нейтропения + пневмония	1 (4,8%)
мукозит I—II ст.	1 (4,8%)
кандидоз слизистой рта	1 (4,8%)
герпетическая инфекция	2 (9,5%)
сепсис + мукозит III ст.	1 (4,8%)
Геморрагические:	7 (33,3%)
кожно-геморрагический синдром	4 (19%)
кожно-геморрагический синдром + кровохарканье	1 (4,8%)
маточное кровотечение	1 (4,8%)
желудочно-кишечное кровотечение	1 (4,8%)

Заключение

Общепринятыми критериями эффективности выхода ГСК в кровь является оценка содержания CD34+-клеток в трансплантате. На эффективность мобилизации CD34+-клеток влияют факторы, связанные с характеристикой доноров (аутодоноров), а именно: возраст, режим мобилизации, количество и характер предшествующих курсов химиотерапии, в том числе наличие/отсутствие облучения, диагноз и степень выраженности фиброзных изменений в костном мозге [6,7]. В зависимости от способности к мобилизации CD34+-клеток доноры-аутодоноры подразделяются на легко-мобилизующие, трудномобилизующие и плохомобилизующие, при количестве в трансплантате CD34+—клеток соответственно $> 5,0 \times 10^6/\text{кг}$, $1—5 \times 10^6/\text{кг}$ и $< 1,0 \times 10^6/\text{кг}$ реципиента [8].

Задержка восстановления гемопоэза наблюдается у 5—35% ауто-реципиентов. На приживление ГСК также влияют факторы, связанные с качеством трансплантируемых клеток, источником ГСК (костный мозг, ПСКК). Другими маркерами качества трансплантата, наряду с CD34+-клетками, являются число ядросодержащих клеток и количество колониеобразующих единиц различных линий кроветворения (гранулоцитарных, эритроцитарных, грануло-эритро-моно-макрофагальных), рассчитанных на 1 кг веса реципиента, а также уровень экспрессии в CD34+ клетках фермента альдегиддегидрогеназы [9,10].

В нашем исследовании, включавшем пациентов, различавшихся по возрасту и диагнозам, не выявлено снижения эффективности в мобилизации ПСКК препаратом Лейкостим по основным параметрам оцен-

ки, предъявляемым к данному виду ростовых факторов, а именно: длительности стимуляции для достижения эффекта, необходимому количеству аферезов, уровню CD34⁺-, ALDH⁺-клеток и КОЕ-ГМ на 1 кг веса реципиента в трансплантате, развитию побочных осложнений. Адекватное качество трансплантата, полученного с помощью Лейкостима, подтверждено при использовании ПСКК для проведения аутологичной трансплантации, при этом сроки восстановления кро-

ветворения у реципиентов не отличались от сроков, наблюдаемых при использовании других препаратов Г-КСФ. Таким образом, эффективность и безопасность отечественного рекомбинантного человеческого Г-КСФ Лейкостима для проведения мобилизации ПСКК с целью их последующей аутотрансплантации подтверждены результатами многоцентрового исследования и сопоставимы с эффективностью и безопасностью зарубежных аналогов.

Л и т е р а т у р а

1. Burger J., Burkle A. The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *Br.J.Haematology* 2007;137:288—96.
2. Gazit Y. Homing and mobilization of hematopoietic stem cells and hematopoietic cancer cells are mirror image process, utilizing similar signaling pathways and occurring concurrently: circulating cancer cells constitute an ideal target for concurrent treatment with chemotherapy and antineoplastic-specific antibodies. *Leukemia* 2004;18:1—10.
3. Lapidot T., Dar A., Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901—10.
4. Птушкин В.В., Селшовкин Г.Д. Методические аспекты получения гемопоэтического трансплантационного материала из

- костного мозга и пениферической крови. *Трансплантология и искусственные органы* 1995;4:34—40.
5. Воробьев А.И., Моисеева Т.Н., Табеева Н.Г. и др. Результаты клинического исследования российского рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора Лейкостим. *Эффект фармакогетер в онкол, гематол и радиол* 2006;2:2—7.
6. Fruehauf S., Seeger T., Topaly J. Innovative strategies for PBSC mobilization. *Cytotherapy* 2005;7:438—46.
7. Ings S., Balsa C., Leverett D. et al. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilized with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used. *Br.J.Haematology* 2006;134:517—25.
8. Tighe C., McKoy J., Events A. et al.

- Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety consideration from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone marrow transplantation* 2007;40:185—92.
9. Fallon P., Gentry T., Balber A. et al. Mobilization of peripheral blood SSC^{lo} ALDH⁺ cells have the phenotypic and functional properties of primitive hematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br.J.Haematology* 2003;123:99—108.
10. Klaus J., Herrmann D., Breikreutz I. et al. Effect of CD34⁺ cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *European J. Haematology* 2006;78:21—8.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕГИЛИРОВАННОГО ЛИПОСОМАЛЬНОГО ДОКСОРУБИЦИНА (КЕЛИКСА) В ГЕМАТОЛОГИИ

О.А. Рукавицын, В.П. Поп

Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва

Из существовавших противоопухолевых средств при лечении солидных злокачественных новообразований и гемобластозов наиболее широкое распространение получили противоопухолевые антибиотики. В связи с широким спектром действия и хорошей эффективностью чаще применяется антрациклиновый антибиотик доксорубин, выделенный из гриба *Streptomyces peucetius var. caesi*. Доксорубин ковалентно связывает ДНК опухолевой клетки, ингибирует топоизомеразу II, образует свободные радикалы, а также непосредственно воздействует на мембрану клеток. При этом опухолевые клетки наиболее чувствительны к препарату в S- и G₂-фазе митотического цикла. Известно, что к основным показаниям

к применению доксорубина относятся рак молочной железы, рак легкого, остеогенные саркомы, саркомы мягких тканей, а также неходжкинские лимфомы (НХЛ), лимфома Ходжкина, множественная миелома. Между тем одним из серьезных осложнений, ограничивающих возможности применения доксорубина, считают кардиотоксичность. Еще в 70-х годах прошлого века было установлено, что в основе влияния доксорубина на мышцу сердца лежит прямое повреждение миоцитов [1]. Кроме того, возможны повреждение митохондрий, нарушение внутриклеточной концентрации кальция, связывание с мембранными липидами, гибель эндотелиальных клеток, апоптоз кардиомиоцитов [2, 3]. Факторами риска