


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО
Начальник отдела
науки и внедрения

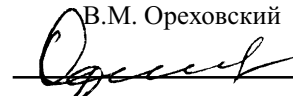
Н.И. Доста



12 марта 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
министра здравоохранения

В.М. Ореховский



12 марта 1999 г.

Регистрационный № 92-9807

АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Минск 1999

Учреждение-разработчик: НИИ гематологии и переливания крови МЗ РБ (НИИ ГПК)

Авторы: канд. мед. наук В.Е. Иванов, Т.И. Терехович, К.В. Сальников, Т.Н. Башманова, Э.И. Давидович-Кветная, В.Н. Смольникова, В.Я. Бекиш, проф. Е.П. Иванов

Рецензент: д-р мед. наук Г.Я. Хулуп

Приведено научно-медицинское, техническое, правовое и моральное обоснование нового метода — аллогенной трансплантации периферических стволовых клеток (аллоТПСК) для лечения злокачественных онкогематологических заболеваний. Обоснованы преимущества, безопасность процедуры, показания и противопоказания, приведены основные принципы выполнения процедуры мобилизации стволовых клеток и мониторинга клинико-лабораторных данных в процессе аллоТПСК.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий костный мозг был единственным источником гемопоэтической ткани и только он традиционно использовался для аллогенной трансплантации гемопоэтической ткани. Но к концу 90-х годов мобилизованные периферические стволовые клетки (ПСК) все чаще стали применяться вместо костного мозга для аллогенной трансплантации при различных, в частности онкогематологических заболеваниях.

Несмотря на кажущуюся схожесть двух процедур ключевые аспекты аллогенной трансплантации периферических стволовых клеток (ТПСК) значительно разнятся от аллотрансплантации костного мозга, в особенности моменты, касающиеся безопасности доноров и связанных с этим деонтологических проблем, применения ростовых цитокинов, влияющих на выход стволовых клеток в периферическую кровь и состав периферических стволовых клеток, проведения лейкаферезов. У аллогенных стволовых клеток доказана иная, чем у костномозговых, гемопоэтическая способность, а взвесь собранных из периферии и введенных реципиенту мононуклеаров имеет качественно другой состав, что влияет на особенности развития и течения болезни «трансплантат против хозяина» и реакции «трансплантат против лейкемии».

В этой связи аллотрансплантацию периферических стволовых клеток (аллоТПСК) следует расценивать как абсолютно новый метод лечения, требующий создания не только новой научно-медицинской и технической базы, но и отдельного обоснования всех правовых и моральных аспектов этой процедуры.

Для донора основными преимуществами аллоТПСК по сравнению с трансплантацией костного мозга являются, во-первых, снижение риска и дискомфорта, связанных с достаточно серьезной хирургической процедурой забора костного мозга с обязательным проведением общей анестезии, дающей до 0,4% летальности, значительной потерей крови и значительной травмой костной ткани; во-вторых, сбор периферических стволовых клеток может быть произведен в амбулаторных условиях. Недостатками следует считать необходимость введения донору гемопоэтических стволовых факторов и необходимость проведения донору одного или нескольких лейкаферезов.

Показано, что реципиент при трансплантации периферических стволовых клеток имеет значительно более быстрое восстановление гемопоэза и иммунокомпетентной системы, что снижает смертность в ранний период от инфекционных осложнений, укорачивает длительность пребывания пациента в стационаре и таким образом снижает общую цену трансплантации.

Одним из наиболее важных преимуществ мобилизованных стволовых периферических клеток перед костным мозгом является тот факт, что стволовые клетки могут быть собраны в значительно большем количестве по сравнению с костным мозгом. Это открывает больший простор для манипуляций с собранными клетками *ex vivo* (graft-engineering).

Имеющийся на сегодняшний день уровень знаний позволяет утверждать, что аллоТПСК является многообещающей альтернативой аллогенной трансплантации костного мозга в целом. Мобилизованные

аллогенные ПСК являются новым богатым источником гемопоэтической и иммунокомпетентной ткани и будут полезны в дальнейшем развитии иммунотерапевтических подходов после неудачной аллогенной трансплантации костного мозга.

Наиболее заманчивым преимуществом аллогенных стволовых клеток по сравнению с костным мозгом является возможность для манипуляции с ними *ex vivo*: проведения Т-клеточной деплеции, экспансии или активации «трансплантат против лейкемии» эффекторных клеток. Основные биологические проблемы аллогенной трансплантации кроветворных предшественников, такие как реакция «трансплантат против хозяина», рецидив или отторжение, могут быть преодолены именно с использованием *ex vivo* манипуляции с этими клетками, что открывает широкие возможности для проведения гаплоидентичных трансплантаций.

С другой стороны, возможность донорства периферических стволовых клеток вместо костного мозга с избежанием общего обезболивания и достаточно серьезной хирургической процедуры послужит большему привлечению неродственных доноров.

БЕЗОПАСНОСТЬ И ПРЕИМУЩЕСТВА ПРОЦЕДУРЫ аллоТПСК ДЛЯ ДОНОРА

Так как в норме у здорового человека количество циркулирующих в периферической крови предшественников гемопоэза очень мало, успешный сбор достаточного количества периферических стволовых клеток от здоровых индивидуумов требует специальной мобилизации этих клеток с помощью гемопоэтических стволовых факторов. Рутинным для применения в данной процедуре стал гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), так как по сравнению с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором он имеет значительно большую мобилизационную эффективность и, что немаловажно, Г-КСФ является самым безопасным (с минимальными побочными эффектами) из всех миелоактивных колониестимулирующих факторов. Препараты «Граноцит» фирмы «Рон-Пуленк» и «Нейпоген» фирмы «Хоффманн Ля Рош» являются зарегистрированными в Республике Беларусь лекарственными формами Г-КСФ.

Действующее вещество препарата «Нейпоген» — филграстимнегликозилированный рекомбинантный метионильный колониестимулирующий фактор гранулоцитов человека. Филграстим является высокоочищенным, негликозилированным протеином, состоящим из 175 аминокислот. Он вырабатывается лабораторным штаммом бактерии *Escherichia coli*, в которую методами генной инженерии был введен ген фактора, стимулирующего колонии гранулоцитов человека. Колониестимулирующий фактор гранулоцитов человека является глюкопротеином, регулирующим продукцию функциональных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Нейпоген, содержащий рекомбинантный Г-КСФ, вызывает заметное увеличение числа нейтрофилов в периферической крови в течение 24 ч с небольшим увеличением числа моноцитов. Как при внутривенном, так и при подкожном введении препарата наблюдается положительная линейная зависимость между дозой и концентрацией Г-КСФ в сыворотке. После однократной дозы филграстима в пределах от 1,7 до

69,0 мкг/кг (короткое внутривенное вливание в течение 30 мин) максимальный уровень Г-КСФ находился в пределах от 5 до 1840 нг/мл. После подкожного введения рекомендуемых доз концентрации достигали максимального значения 118 нг/мл, а затем оставались на уровне выше 10 нг/мл в течение 8–16 ч.

Выведение Г-КСФ из организма протекает по кинетике 1-го порядка как после подкожного, так и после внутривенного введения. Среднее значение периода полувыведения Г-КСФ из сыворотки крови составляет около 3,5 ч, а величина клиренса приблизительно равна 0,6 мл/мин/кг.

Непрерывное вливание препарата «Нейпоген» больным, выздоравливающим после аутологической пересадки костного мозга, не приводило к явлениям кумуляции и увеличению периода полувыведения. Показано, что нейпоген, применяемый в дозах до 70 мкг/кг/сут, является эффективным и хорошо переносимым препаратом.

По регистрационным документам доклинических испытаний на препарат «Граноцит» фирмы-изготовителя «Рон-Пуленк-Рорер», препарат был успешно испытан на достаточном количестве здоровых индивидуумов в дозах 10 мкг/кг/сут в течение 6 дней и доказал свою безопасность и эффективность.

Применение препарата Г-КСФ здоровым донорам стало возможным на основании постановления Фармакологического комитета Министерства здравоохранения Республики Беларусь (протокол № 1 от 25 марта 1998 г.) о разрешении клинических испытаний препаратов Г-КСФ «Граноцит» и «Нейпоген» по новому показанию — для мобилизации у здоровых доноров для их аллогенной трансплантации больным с онкогематологическими заболеваниями.

Основным побочным эффектом Г-КСФ являются костные боли и гриппоподобные симптомы, которые появляются у большинства доноров, которые получают Г-КСФ в дозах 7,5 и более мкг/кг в день. Эта симптоматика хорошо купируется приемом периферических анальгетиков, в первую очередь парацетамолом, и почти моментально, на следующий день, исчезают после отмены Г-КСФ. Около 10–30% здоровых доноров, которым вводился Г-КСФ, имели симптомы головной боли, слабости, тошноты или инфлюэнцеподобных симптомов. Показано, что уровни натрия, калия, мочевины, креатинина, мочевой кислоты и билирубина оставались неизменными у всех доноров во время применения Г-КСФ. У некоторых доноров отмечалось обратимое незначительное повышение щелочной фосфатазы и лактатгидрогеназы. У части доноров имелось незначительное снижение калия до субнормальных цифр в дни введения Г-КСФ, которое в редких случаях требовало орального возмещения калия. Этот феномен в большинстве статей объясняется увеличенным нейтрофильным обменом под воздействием Г-КСФ. Этот препарат индуцирует быстрый и дозозависимый лейкоцитоз до $50\text{--}70 \times 10^9/\text{л}$ при дозе 10 мкг/кг. Однако не имеет никакого влияния на уровень гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов. Геморрагических осложнений не описано ни в одном случае. В редких случаях после отмены Г-КСФ отмечена транзиторная незначительная нейтропения, которая в литературе связывается с ингибиторной активностью других цитокинов, вовлеченных в регуляцию гранулоцитопоза, или супрессией эндогенной продукции Г-КСФ после экзогенного введения высоких доз препарата (эффект, подобный синдрому отмены при терапии кортикостероидными препаратами).

К сегодняшнему дню в медицинской литературе опубликовано множество работ, где Г-КСФ назначался без всяких побочных эффектов большим когортам здоровых доноров, таким, как доноры гранулоцитарной массы, доноры ПСК, а также добровольцы. Наибольший период наблюдения за этими когортами больных на сегодняшний день составляет 5–8 лет. И ни в одном случае не было отмечено никаких долгосрочных побочных эффектов. А исследование костного мозга у нормальных доноров, которые получали Г-КСФ 5 лет назад не показали ни морфологических, ни цитогенетических аномалий. К настоящему времени показано, что при некоторых патологических состояниях, таких как острые инфекции, отмечается очень значительное повышение уровня эндогенного Г-КСФ, концентрации которого сравнимы с концентрациями в крови при введении Г-КСФ здоровым донорам.

Риск лейкафереза также очень низок. Из 348 пациентов в 12 исследованиях имел место 1 случай инфаркта миокарда в короткий период после лейкафереза и сбора ПСК, а 2 других донора имели ИБС-подобные симптомы во время лейкафереза. Кроме того, некоторые доноры жаловались на неприятные ощущения в местах установки катетера во время лейкафереза, которые полностью исчезли после окончания процедуры. Около 10% доноров нуждаются в установке центрального венозного катетера для обеспечения адекватного тока крови при большеобъемных лейкаферезах. Остальные больные обходятся установкой двух периферических катетеров.

ПОКАЗАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ОПЕРАЦИИ аллоТПСК

В таблице 1 представлены основные нозологические формы, которые являются показаниями для аллоТПСК. Показания в целом аналогичны таковым для трансплантации костного мозга, однако их перечень может быть расширен повторными аллоТПСК, после рецидива аллоТКМ.

Результаты значительно варьируют в зависимости от нозологической формы и стадии заболевания: например, пересадка при ХМЛ в хронической фазе дает около 60–75% выздоровления, тогда, как трансплантация в бластном кризе — только 10–15%. Около 50% пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), трансплантированные в первой полной ремиссии, выздоравливают после этой операции. По мере прогрессирования ОМЛ процент вероятности выздоровления снижается: при ТКМ в первом релапсе — 30%, во второй ремиссии — 25–28%. Миелодиспластический синдром из-за своей необратимой прогрессии является при наличии совместимого донора абсолютным показанием к трансплантации у пациентов до 40 лет.

Все возрастающее количество детей, выздоравливающих от ОЛЛ, часто приводится как пример триумфа классической рациональной комбинированной химиотерапии. Использование интенсивной индукции и консолидации в сочетании с применением прогностических факторов для выбора более мощного режима у пациентов с высоким риском позволило добиться 60–80% выздоровления у детей в зависимости от степени риска. Однако имеется группа детских ОЛЛ, которая изначально очень плохо поддается стандартной химиотерапии: ОЛЛ с транслокациями 4;11 и 9;22, высоким ($>100000 \cdot 10^9/\text{л}$) лейкоцитозом на момент обнаружения заболевания, неблагоприятным фенотипом

(ноль-ОЛЛ, гибридные формы с присутствием как миелоидных, так и лимфоидных маркеров). Для таких пациентов аллоТКМ является альтернативным методом лечения и может предложить больший шанс на выздоровление.

Таблица 1

Показания для аллоТКС

Злокачественные	Незлокачественные	Приобретенные
1. Острые нелимфобластные лейкозы (ОНЛЛ)	1. Врожденные иммунодефициты: а) тяжелый комбинированный иммунодефицит, б) Т+В- лимфоцитарная недостаточность, в) миелоидная неполноценность иммунитета (синдром Чедиака — Хигаси), гистиоцитозы, остеопорозы	1. Апластическая анемия 2. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия 3. Миелофиброз
2. Хронический миелолейкоз (ХМЛ)		
3. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)		
4. Множественная миелома (миеломная болезнь)	2. Гемоглобинопатии	
5. Неходжкинские лимфомы	3. Мукополисахаридозы	
6. Лимфома Ходжкина (лимфогранулематоз)	4. Липидозы	
	5. Гликогенозы	
7. Миелодиспластический синдром		
8. Волосатоклеточный лейкоз		
9. Солитарные опухоли: а) рак молочной железы, яичников, легких, яичек, толстого кишечника, б) меланома, в) саркомы, г) церебральные глиомы		

Химиотерапевтическое лечение ОЛЛ у взрослых по протоколам, аналогичным детским, к сожалению, оказалось не столь эффективным. Большинство центров, используя и для взрослых разделение на группы риска, пациентам с высоким риском выполняют пересадку уже в первой ремиссии. Для остальных взрослых аллотрансплантация ста-

новится терапией выбора в последующих ремиссиях, когда исчерпаны возможности стандартных схем. Но по сей день нет единого мнения на этот счет: хотя ТКМ и дает более высокую вероятность излечения при взрослых ОЛЛ с плохим прогнозом, высокая смертность от пост-ТКМ осложнений практически сравнивает результаты с таковыми после обычной программной химиотерапии.

ОТБОР И СХЕМА ОБСЛЕДОВАНИЯ ДОНОРА

Любой практически здоровый человек, изъявивший добровольное согласие, может стать донором гемопоэтической ткани для HLA-совместимого больного (родственника или нет) с онкогематологическим заболеванием, которому показано проведение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для спасения жизни этого тяжело больного человека.

После того, как донор дает согласие быть таковым для HLA-совместимого больного, на его усмотрение предлагается альтернатива: либо забор костного мозга, либо забор периферических стволовых клеток с полным объяснением преимуществ, недостатков и опасностей обеих процедур.

Донору представляется «Информативный консенсус» для подписания согласия на процедуру аллоТПСК в качестве альтернативы большой хирургической операции забора костного мозга под общей анестезией. Содержание консенсуса приведено ниже.

Допуск доноров к мобилизации и цитаферезу по возрасту решается индивидуально: может быть в пределах 17–55 лет.

Первичное обследование донора проводится в амбулаторных условиях или клинике (они госпитализируются при отсутствии возможностей проживания вне стационара).

На донора заводится амбулаторная карта или история болезни.

Обследованием предусматривается:

- объективный осмотр, тщательный сбор анамнеза;
- исследование биохимических тестов с обязательным определением аминотрансфераз и сывороточного железа, коагулограммы;
- исследование крови на наличие австралийского антигена, выполнение серологических реакций на сифилис, гепатиты;
- ЭКГ, рентгенологическое исследование органов грудной клетки;
- анализ мочи.

При необходимости к обследованию привлекаются специалисты — гинеколог, дерматолог и т.д.

В каждом случае консилиум врачей индивидуально решает вопрос о допуске донора к мобилизации и аферезам.

№	Трансплантация костного мозга	Трансплантация периферических стволовых клеток
1.	Госпитализация в отделение трансплантации костного мозга с целью подготовки к забору костного мозга	Введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора 1 раз в сут подкожно в течение 5 дней подряд в условиях дневного стационара
2.	Забор костного мозга (длительность около 1–1,5 ч в асептических условиях операционной): <ul style="list-style-type: none"> – общий интубационный наркоз (возможна комбинация с внутривенным наркозом); – непосредственно забор костного мозга: до 300 пункций крыла и гребня подвздошной кости с получением до 1,5 л костного мозга; – выход из наркоза (около 3 ч) 	Забор периферических стволовых клеток (длительность около 3 ч в асептических условиях процедурного кабинета): <ul style="list-style-type: none"> – отсутствие наркоза; – катетеризация 2-х периферических (локтевых) вен; забор до 250 мл лейкоцитарной взвеси с одновременным возвратом других компонентов крови донору (процедура, аналогичная донорскому плазмо- либо тромбоцитозезу)
3.	Восстановительный период — до 3 сут в отделении реанимации или ТКМ	Восстановительный период без особенностей (аналогичен восстановлению после донорской сдачи компонентов крови)
4.	Имеется вероятность повтора процедуры в связи с малой клеточностью полученного во время первого забора костного мозга	Возможен повторный забор периферических стволовых клеток, максимум — до 3 заборов ежедневно (вероятность второго и третьего забора около 40 и 20% соответственно, благодаря применению гранулоцитарного колониестимулирующего фактора). В 60% случаев достаточно одного афереза

Я, _____, донор для больного _____, ознакомившись со всеми преимуществами, недостатками и опасностями обеих процедур, добровольно выбираю процедуру _____ для забора у меня стволовых кроветворных клеток.

(роспись) «__» _____ 20__ г.

Противопоказаниями к даче ПСК являются:

- наличие в сыворотке крови антигена гепатита В;
- сифилис, СПИД, туберкулез;
- гипертоническая болезнь II–III степени, ХИБС, органические поражения сердца и коронарных сосудов;
- злокачественные новообразования;
- язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки в фазе обострения, кровоточащие поражения слизистой желудочно-кишечного тракта;
- органические поражения легких, печени, почек, коллагеновых заболеваний;
- хронический сепсис;
- перенесенные операции удаления почки, а также других органов по поводу рака;
- острые и хронические воспалительные процессы любой локализации в фазе обострения;
- органические поражения ЦНС и психические заболевания;
- аллергические заболевания кожи в фазе обострения, тяжелые хронические заболевания кожи инфекционного или грибкового характера;
- бронхиальная астма;
- период беременности и лактации, срок до 1 года после нормальных родов;
- диабет;
- наркомания, алкоголизм.

Допустимый период с момента перенесенных острых инфекционных заболеваний, а также прививок до момента мобилизации и аферезов аналогичен таковому, установленному для активных доноров крови.

Если обследование донора проводилось в амбулаторных условиях, его госпитализируют в дневной стационар не позже, чем за сутки до первого афереза. При этом в истории болезни отмечается цель госпитализации донора, подробно записывается решение консилиума, допускающего его к мобилизации и аферезам. При близкородственном донорстве, когда донор, несмотря на противопоказания по соматическому заболеванию, проявляет упорную осознанную настойчивость для спасения жизни своего близкого родственника, допуск его к процедуре афереза должен решаться индивидуально авторитетным врачебным консилиумом.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ МОБИЛИЗАЦИИ И ЗАБОРА АЛЛОГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

В связи с новизной процедуры и отсутствием стандартизованных подходов на основе Консенсуса Европейской группы трансплантации костного мозга и крови (ЕВМТ) (октябрь 1995 г., Женева, Швейцария) в НИИ ГПК было разработано и утверждено в Фармакологическом комитете РБ «Временное положение о проведении процедуры аллогенной пересадки гемопоэтических стволовых клеток периферической крови от НЛA-совместимых доноров», которое включает следующие основные пункты, рекомендуемые к выполнению при использовании вышеназванной процедуры в Республике Беларусь:

1. Рекомендуется проводить мобилизацию стволовых клеток периферической крови (СКПК) у доноров с помощью препарата Г-КСФ, в дозе 10 мкг/кг/день ежедневно с началом аферезов на следующий день после введения 4-й дозы. Препарат «Нейпоген» (Хоффман Ля Рош) или «Граноцит» (Рон Пуленк) вводится подкожно, одномоментно вся суточная доза. При введении мобилизационной дозы препарата целесообразен профилактический — за 1 ч–30 мин — прием парацетамола в дозе 1 г per os.

2. Рекомендуется проводить аферезы на гематологических сепараторах с постоянным током крови в объеме до 15 л крови в течение одного афереза и с использованием катетеризации периферических вен. Забор периферических стволовых клеток крови осуществляется методом лейкоафереза. В день афереза Г-КСФ вводится не ранее, чем за 2 ч до начала процедуры. Процедура забора СКПК выполняется на сепараторе клеток крови (например, «СОВА SPECTRA» (GAMBRO, США)) по стандартной программе большеобъемного цитафереза, с установкой двух периферических, а при необходимости (например, отсутствие периферических вен достаточного диаметра) центральных катетеров.

3. Минимальной необходимой дозой CD34+ клеток следует считать дозу в $2-3 \times 10^6$ /кг веса реципиента. Если после первого афереза не удастся достичь достаточного количества CD34+ клеток, вводится следующая доза Г-КСФ и на следующий день повторяется аферез. Определение CD34+ клеток (ранних предшественниц гемопоэза, включающих в себя стволовые кроветворные клетки) необходимо для оценки «достаточности» количества забранных у пациента до трансплантации кроветворных клеток. Установлено, что для успешного восстановления гемопоэза необходимо трансплантировать не менее 2×10^6 /кг веса реципиента CD34+ клеток. Трансплантация меньшего числа CD34+ клеток может привести к задержке восстановления иммуногемопоэза или к неприживлению трансплантата и гибели пациента.

Методика подсчета CD 34+ клеток в лейкоконцентрате

CD34+клетки определяют методом проточной цитофлуориметрии. Для постановки методики иммунофлуоресценции берется взвеси клеток в PBS с концентрацией 6–8 млн/мл. К взвеси клеток добавляется 100 мл PBS с 0,1% NaN_3 , 1% PBS и вносится по 10 мкл МКА CD45 (NLC-1) FITC, CD34 (Anti pcPA-2) PE (BD). Клетки с МКА инкубируют в темноте при комнатной температуре 20–30 мин. По окончании инкубации к клеточной взвеси добавляют 2 мл лизирующего раствора (BD), инкубируют в темноте при комнатной температуре 10 мин. После лизиса эритроцитов клетки отмывают PBS двукратно центрифугированием по 5 мин при 1500 об./мин. Отмытые клетки фиксируют в 200–300 мл 1% параформальдегида в PBS. Для контроля неспецифического окрашивания используют изоспецифический контроль AT IgG_{2a} FITC, IgG, PE (BD), обрабатывая клетки согласно данной методике.

Загрузка и анализ результатов проводится на проточном цитофлуориметре FACScan (15.1 W, 488 нм) в программе LYSYS II. CD34+клетки определяют в регионе CD45+ экспрессирующих клеток, учитывая распределение клеток по FSC (прямому свертыванию).

К настоящему времени точно установлено, что пик CD34+ клеток в периферической крови, как правило, наблюдается на пятый день после назначения Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг. Несмотря на продолжающиеся после пятого дня назначения Г-КСФ, уровень циркулирующих кроветворных предшественников значительно снижается после седьмого дня. что указывает на то, что оптимальные сроки сбора периферических стволовых клеток лежат в дни 5–7 после начала Г-КСФ. Мобилизационная эффективность Г-КСФ является дозозависимой. Мобилизация с помощью Г-КСФ в дозах 10–16 мкг/кг позволяет, как правило, собрать достаточное количество CD34+ клеток за 1–2 лейкофереза у большинства здоровых индивидуумов.

4. В любом случае, где это возможно, СКПК должны вводиться реципиенту без предварительного замораживания. Время мобилизации должно быть выбрано так, чтобы первый аферез у донора приходился на день «0» реципиента, и тогда концентрат ПСК, содержащий минимальное количество плазмы и не содержащий эритроцитов, может быть перелит в периферическую вену реципиенту непосредственно после окончания цитафереза с минимальной премедикацией в виде медленной инфузии. Последующие аферезы и инфузии проводятся соответственно в дни +1, +2, +3 для реципиента.

5. Реципиент должен получать стандартное кондиционирование и профилактику РТПХ, такие же, как и при пересадке костного мозга, установленные в данном конкретном Центре для данной нозологии. В случае повторных ежедневных инфузий СКПК нулевым днем (день 0) следует считать день, в который был бы введен донорский костный мозг.

В связи с тем, что в процессе процедуры мобилизации СКПК у донора ему необходимо проводить короткий курс препарата Г-КСФ, на основе имеющегося на сегодняшний день мирового опыта констатировано, что этот препарат не вызывает у доноров, его получавших в данной дозе и для данной процедуры, каких-либо необратимых, угрожающих их здоровью или жизни, состояний.

Противопоказания к применению препарата G-CSF

Противопоказан к применению у доноров с гиперчувствительностью к препарату или его компонентам.

Предупреждение

Перед введением донору первой дозы препарата обязательно проведение пробы на чувствительность в виде подъязычной пробы, выполненной в соответствии с рекомендациями Республиканского аллергологического центра, утвержденными Главным управлением кадров, науки и внешних связей Министерства здравоохранения РБ 30 августа 1993 г.: «Одна капля препарата вносится в подъязычную область. Наблюдать 20–30 мин. При наличии жжения, затрудненного дыхания промыть полость рта холодной водой. Дальнейшие пробы прекратить!»

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОГРАММЫ (МОНИТОРИНГА) КЛИНИКО-АБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ПРОЦЕССЕ аллоТПСК

Программа клинико-лабораторных исследований для аллоТПСК разработана исходя из 3, 5-летнего опыта мониторинга гомеостаза при ТКМ у 80 больных различными формами лейкоемий и миелогипоплазий Белорус-

ского гематологического центра, используя программы отделения ТКМ Гематологического центра России

Мониторинг, прежде всего, необходим для динамического наблюдения за состоянием жизненно важных органов и систем организма пациента.

Здесь особое значение имеют оптимальность и информативность объема исследований и их частота, кратность, складывающиеся в алгоритм мониторингового наблюдения за больным при выполнении всего процесса трансплантации.

Абсолютные условия кондиционирования

1. Изоляция больного в ламинарном боксе с обеспечением условий максимальной стерильности.
2. Оптимальный клинико-лабораторный скрининг.
3. Создание условий для постоянной коррекции гомеостаза медикаментами, с помощью трансфузий в многолинейный центральный венозный катетер инфузоматом.
4. Наличие достаточного количества дериватов крови и, прежде всего, тромбоконцентрата, криоплазмы, альбумина, иммуноглобулина.
5. Наличие облучателя полученных на сепараторе тромбоцитов для снижения иммунизации реципиента.

Мониторинг токсических осложнений у реципиентов аллоТПСК

При кондиционировании цитостатическими препаратами происходит тотальное разрушение многих клеток и тканей, прежде всего кроветворной и иммунной систем.

Согласно международной оценке токсичности принята шкала токсичности ВОЗ, которую следует дополнять в динамике оценкой развивающихся комплексных синдромов.

А. Геморрагического — мониторинг по клинической оценке типов нарушения первичного и вторичного гемостаза, гемостазиограмме и количеству тромбоцитов.

Б. Кардиопатического — мониторинг по клинико-инструментальному обследованию.

В. ВОБ — клинико-гемостазиологическое мониторинг.

Г. Энцефалопатический и дисфункции периферической нервной системы.

Д. Гипертермический — мониторинг температуры тела.

Е. Инфекционно-септический — клинико-иммунологический мониторинг, а также органной патологии: миокардит, гепатит, нефрит, геморрагический цистит, меноррагии.

Следует учитывать медикаментознозависимую патологию:

1. Кардиотоксичность — чаще дают препараты антрациклинового ряда, циклофосфамид.

Мониторинг — ЭКГ — 1 раз в неделю. Трансаминазы — ежедневно (1–2 раза в сутки). По показаниям — ультразвуковое исследование сердца.

2. Легочная токсичность (пульмониты) — кармустан (BC N4). R-графия — 1 раз в неделю.

3. Гепатит и ВОБ печени вызывается комплексом факторов тканевой, вирусной, химической природы, в т.ч.

антибиотики, иммуносупрессоры (циклоспорин А и др.).

Контроль — клиническая оценка. Ежедневное определение активности трансаминаз, билирубина, щелочной фосфатазы, протромбинового индекса, АТШ, протеина С.

4. Нефротоксичность — мелерелан; гемолитический фактор.

Мониторинг — уровень креатинина, мочевины, электролиты сыворотки и мочи, суточный диурез.

5. Энтеропатия — синдром цитостатической болезни.

6. Мукозит и как его органное проявление — геморрагический цистит — болезни дозы циклофосфамида.

7. Синдром патологии первичного гемостаза — цитостатическая гипоплазия мегакариоцитарного ростка.

Ежедневный контроль.

8. Мониторирование уровня циклоспорина А в крови при аллогенной ТКМ.

Определение циклоспорина А в сыворотке крови 1 раз в неделю, а по клиническим показаниям — 1–2 раза в сутки с одновременным определением уровня магния.

9. По опыту НИИ ГПК для оценки приживления аллотрансплантанта с целью контроля «химеризма» важен мониторинг функционирования КМ по эритроцитарным антигенам системы АВО.

Для чего необходимо определение титров альфа- и бета-изогемагглютининов (при разных группах у донора и пациента) и мониторинг по системам резус, Келл, Даффи, Челлано, MNSs (при одноклассовой трансплантации).

10. Анализ половых хромосом в клетках концентрата ПСК при разнополой трансплантации.

Изогемагглютинины и кариотип целесообразно определять в конце первого месяца после трансплантации, повторяя контроль 1 раз в 2–3 месяца.

На основе приведенных выше методологических принципов мониторинга при аллоТПСК для терапии больных лейкозами и миелогипоплазиями, основываясь на собственном опыте и опыте зарубежных исследователей, разработана наиболее полная констелляция лабораторных исследований и их кратность при проведении протокола кондиционирования.

Перечень клинико-лабораторных исследований мониторингования гомеостаза у реципиентов аллоТПСК

1. Анализ крови, мочи — ежедневно.

2. рН мочи — 3 раза в сутки при применении высокодозного циклофосфамида.

3. Биохимический анализ крови (билирубин, АсТ, АлТ, мочевины, креатинин) — ежедневно.

4. Уровень электролитов (К, Na, Са), глюкозы в плазме — 3 раза в сутки, если применяется ощелачивающий форсированный диурез на фоне высокодозного циклофосфамида или форсированный диурез на фоне высокодозного мелфалана.

5. Уровень Mg — 3 раза в сутки при применении Циклоспорина А.

6. Температура тела, пульс, артериальное давление, частота дыхания, центральное венозное давление — 6 раз в сутки.

7. Масса тела — 1 раз в сутки.
8. Масса съеденной пищи и объем выпитой жидкости за сутки.
9. Суточный диурез.
10. Стул — количество раз в сутки.
11. Уровень К, Na, мочевины, при необходимости — глюкозы в суточной моче.
12. ЭКГ и рентгенография органов грудной полости — 1 раз в неделю и по показаниям.
13. Маркеры гепатита А, В, С, дельта- цитомегаловирусной инфекции, вируса простого герпеса 1 и 2 типа — 1 раз в неделю.
14. Бактериологическое исследование — посевы из носа, рта, подмышечной впадины, места центрального венозного катетера из-под кожи, препуциального кольца (влагалища) — раз в неделю.
15. Гемостазиологические исследования (см. «мониторинг плазменного гемостаза у реципиентов ауто-аллотрансплантации»).

Мониторинг плазменного гемостаза у реципиентов аллоТПСК

У пациентов, подвергающихся операции трансплантации аллогенных периферических стволовых клеток, высок риск осложнений со стороны системы гемостаза. Их уникальное состояние, характеризующееся поражением всех трех звеньев гемостаза (глубокой тромбоцитопенией, токсическим поражением печени и эндотелия), приводит к частым осложнениям как геморрагического, так и тромботического характера. Гепарин, назначаемый пациентам для профилактики веноокклюзионной болезни печени в период глубокой тромбоцитопении, является еще одним мощным антикоагулянтным стимулом, увеличивающим риск кровотечения. В таких условиях очень важно обеспечить мониторинг системы гемостаза, охватывающий все его звенья (плазменные факторы свертывания, антикоагулянтное звено, фибринолиз).

Предложенный нами протокол, в первую очередь имеет огромную практическую ценность, позволяя своевременно проводить диагностику и коррекцию нарушений в системе гемостаза у пациентов в ходе режима кондиционирования и в посттрансплантационный период.

Протокол исследования

Набор тестов:

1. Каолин-кефалиновое время.
2. Уровни факторов VIII, IX, vWF.
3. Аутокоагулограмма.
4. Протромбиновый индекс.
5. Фибриноген.
6. p-нафтоловая проба
7. Тромбиновое время.

8. Антитромбин III.
9. Спонтанный фибринолиз.
10. Эуглобулиновый фибринолиз.
11. ХЗФ.
12. Ретракция кровяного сгустка.
13. Фибриназа.

Частота заборов крови

- 1° За 1 день до начала режима кондиционирования (день — 10–9 — в зависимости от протокола).
- 2° В середине режима кондиционирования (день–5–4–в зависимости от протокола).
- 3° День 0 — до инфузии костного мозга.
- 4° День +1.

Далее, в течение первого месяца после ТКМ — мониторинг плазменного гемостаза не реже 2-х раз в неделю. С +31-го дня — 2 раза в неделю (на весь период пребывания в стационаре). После выписки — при каждом амбулаторном контроле.

Правила забора крови

С учетом гепаринизации центрального катетера для получения достоверных данных необходимо строго соблюдать следующую последовательность забора крови:

1. Остановить внутривенное введение всех препаратов по всем трем линиям на 3 мин.
2. По прошествии 3 мин осуществить забор из линии Циклоспорин А:

первые 5 мл крови набрать в первый шприц в качестве промывки катетера, затем во второй шприц набрать 15 мл крови и разлить по следующим пробиркам:

пр. № 1: силиконированная пробирка с цитратом натрия. Пропорция цитрат/кровь — 1:9. Количество крови 7–8 мл (общие тесты, заморозка);

пр. № 2: силиконированная пробирка с 0,3 мл цитрата натрия и 3 мг S-AKK. Кровь — до 3 мл общего объема (РКМФ);

пр. № 3: несиликонированная пробирка с якорьком с 3 мг S-AKK. Количество крови — 2 мл (ретракция кровяного сгустка);

пр. № 4: несиликонированная пробирка с 2 мг S-AKK. Количество крови — 2 мл (сыворотка для контроля РКМФ и ПДФ). Общий объем цельной крови для полной каогулограммы — 14–15 мл.

3. Возобновить введение препаратов по всем линиям.

Заморозка и хранение образцов

Цитратная плазма каждого пациента в равных объемах (по 0,3–0,5 мл) раскапывается в 3 пробирки Eppendorf и замораживается при — 20° С.

В заключении необходимо отметить, что разработанный метод мобилизации и забора периферических стволовых клеток может быть полностью перенесен на пересадку стволовых клеток из периферической крови неродственного, HLA-совместимого донора, так как в разработанной нами части процедуры, которая включает обследование донора, протокол мобилизации ПСК и их сбора с помощью аферезов, отсутствуют какие-либо различия между родственным и неродственным донорством. Основное отличие имеет место только на этапе подбора неродственного донора по HLA-иммунологическому и ДНК-типированию, что не является темой данных методических рекомендаций.