

И.С. Долгополов, Р.И. Пименов, В.К. Бояршинов, Н.Н. Субботина, Л.Ю. Гривцова,  
Д.М. Мхеидзе, Г.Л. Менткевич

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

## Результаты и методика сбора стволовых клеток периферической крови у детей и подростков

Проанализировано 592 сеанса лейкофереза (ЛФ) у 340 детей с целью сбора периферических стволовых клеток (ПСК) после стандартной химиотерапии и назначения гранулоцитарного (Г-КСФ) или гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ; 94%) или только Г/ГМ-КСФ (6%) в состоянии стабильного кроветворения. Основным ориентиром для начала сеанса ЛФ являлись уровни лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. В среднем за один сеанс ЛФ было собрано  $3,8 (0,1-22,7) \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/кг, или  $1,6 (0,006-18,9) \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/кг на один объем циркулирующей крови пациента при уровне лейкоцитов и тромбоцитов в крови на момент начала ЛФ  $17,5 (0,9-109)$  и  $182 (11-782) \times 10^9$ /л, соответственно. В группе из 128 детей со средним весом  $14,2 (8-20)$  кг было успешно проведено 176 сеансов ЛФ. У пациентов с весом менее 12 кг экстракорпоральная линия заполнялась донорской эритроцитарной массой. Не выявлено разницы в результатах сбора ПСК, если КСФ назначался непосредственно после окончания химиотерапии или отсрочено — в фазе выхода из аплазии кроветворения.

**Ключевые слова:** периферические стволовые клетки, лейкоферез, колониестимулирующий фактор, дети, подростки.

### ВВЕДЕНИЕ

За последние 15–20 лет интенсификация протоколов лечения, включающая фазу высокодозной химиотерапии с поддержкой аутологичными гемопоэтическими стволовыми клетками, не только прочно заняла место в протоколах лечения опухолей высокого риска у детей, но и позволила улучшить прогноз у некоторых групп онкологических больных. Теоретической основой этой стратегии является подтвержденный как в эксперименте, так и в клинической практике феномен нарастания эффекта с увеличением дозы ряда химиопрепаратов (феномен «доза–эффект»). Для достижения достоверной разницы в выживаемости при опухолях с неблагоприятным прогнозом дозы химиопрепаратов должны быть увеличены в несколько раз по сравнению со стандартными. Общим фактором, ограничивающим эскалацию доз химиопрепаратов, используемых для высокодозной химиотерапии, является гемато-

логическая токсичность. Аутотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток — инструмент, позволяющий преодолеть это препятствие и интенсифицировать химиотерапию (ХТ) в несколько раз. Если в середине 80-х годов основным источником гемопоэтических клеток-предшественников служил костный мозг, то в настоящее время около 80% аутологичных трансплантаций проводится с использованием циркулирующих периферических стволовых клеток [1, 2]. Растет доля периферических стволовых клеток (ПСК) и в случае проведения аллогенных трансплантаций.

Несмотря на достаточно большой опыт в сборе ПСК у детей, до сих пор нет единого мнения по поводу целого ряда вопросов, таких как оптимальные дозы и комбинации факторов, применяемых для мобилизации ПСК; оптимальный венозный доступ и протокол сбора у детей с малым весом; сроки начала мобилизационной терапии и т.п. [3, 4].

I.S. Dolgoplov, R.I. Pimenov, V.K. Boyarshinov, N.N. Subbotina, L.Yu. Grivtsova, D.M. Mheidze,  
G.L. Mentkevich

Russian Oncological Scientific Center named. N.N. Blokhin, Moscow, Russian Federation

### Peripheral Stem Cell Collections in Children and Adolescent

We report the data of 340 children with poor-prognosis solid tumors who had 592 PBSC harvests on cell separators after mobilization mainly by different treatment protocol chemotherapy regimens followed by G- or GM-CSF (94% of patients) or by G-/GM-CSF alone (6%). Timing of procedure was predicted by studying the blood count. When the WBC and platelet reached a median of  $17,5 (0,9-109)$  and  $182 (11-782) \times 10^9$ /L, respectively, the median number of  $3,8 (0,1-22,7) \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg with  $1,6 (0,006-18,9) \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg for 1 blood volume processed was obtained per procedure. In the group of 128 patients with low body weight [median  $14,2 (8-20)$  kg] 176 LP were successfully performed. The extracorporeal line was primed with donor RBC in the patients with the weight below 12 kg. We observed no difference in CD34<sup>+</sup> content in harvests whether CSF was begun on d+1 or on d+3 after chemotherapy or in later in the phase of hematopoiesis recovery.

**Key words:** peripheral stem cells, leukapheresis, colony stimulating factor, children, adolescent.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика больных

С 1996 по 2010 г. нами проведено 592 сеанса сбора ПСК у 340 детей (162 девочки и 178 мальчиков) с солидными опухолями и гемобластомами из групп неблагоприятного прогноза и высокого риска. Двадцать больных находились на лечении по поводу рецидивной или резистентной к предыдущей химиотерапии нефробластомы, у 46 больных диагностирована нейробластома высокого риска, у 119 — саркома Юинга высокого риска, у 29 — острый миелоидный лейкоз высокого риска, у 31 — опухоли центральной нервной системы, у 21 — лимфома Ходжкина, у 7 — неходжкинские лимфомы, у 24 — ретинобластома высокого риска, у 19 — мягкотканые саркомы и у 3 — метастатическая остеосаркома. Средний возраст в группе 8,7 (0,6–20) лет, средний вес 30,7 (8–87) кг. Число курсов химиотерапии, полученных перед первым сеансом сепарации ПСК, в среднем равнялось 3 (1–19). Только 249 из 340 (73,3%) больных получили 3 и менее курсов химиотерапии, включая мобилизационный. У 134 больных (40%) имелись метастазы в костный мозг на момент постановки диагноза. У всех этих больных на момент первого сеанса сепарации при цитологическом исследовании костного мозга злокачественных клеток обнаружено не было. Более того, условием для принятия решения о начале мобилизации было отсутствие злокачественных клеток в костном мозге пациента на оптическом уровне в течение не менее 2 предыдущих курсов химиотерапии подряд.

Учитывая тот факт, что основные трудности возникают при сепарации ПСК у детей с низкой массой тела, особенно следует отметить подгруппу больных, включающую 128 (38%) детей с весом 20 кг и менее. Средний возраст в этой подгруппе 3,7 (0,6–10) лет, средний вес 14,2 (8–20) кг. В 33 случаях диагностирована нейробластома высокого риска, в 8 — рецидивная или резистентная нефробластома, в 25 — саркома Юинга, в 11 — опухоли центральной нервной системы, в 20 — ретинобластома, в 6 — острый миелоидный лейкоз и в 2 — лимфома Ходжкина. Подавляющее большинство пациентов предварительно получили интенсивное комбинированное лечение. Среднее количество курсов химиотерапии до момента первого сбора составило 3 (0–12) на одного больного. Причем после оперативного вмешательства или после лучевой терапии без предварительной ХТ сеансы сбора ПСК проводились лишь у 9 больных в этой группе.

На момент начала лейкафереза (ЛФ) у всех больных был достигнут положительный ответ (полная или частичная ремиссия) со стороны первичной опухоли и/или метастазов, и в пунктате костного мозга метастазы опухоли микроскопически не выявлялись.

### Мобилизационные режимы

Подавляющее большинство (556 из 592) сеансов лейкафереза (94%) проведены после мобилизационных режимов, включающих химиотерапию с последующим назначением одного из миелоцитокинов или их комбинации. ПСК были последовательно мобилизованы при помощи различных колониестимулирующих факторов (КСФ). Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) назначался 302 больным (527 сеансов),

гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) — 38 (65 сеансов). Применялись различные химиотерапевтические режимы в зависимости от диагноза и требований используемых на тот момент протоколов лечения. В 6% случаев (21 больной; 36 сеансов) ПСК были мобилизованы при помощи Г-КСФ или ГМ-КСФ без предварительной химиотерапии. В этом случае гемопоэтические факторы роста назначались после стабильного восстановления всех 3 ростков гемопоэза.

Для больных с нефробластомой применялся в основном режим ИВК/ЦВК, включающий ифосфамид по 1800 мг/м<sup>2</sup> в день или Циклофосфан по 400 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1–5), Вепезид по 100 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1–5) и карбоплатин по 500 мг/м<sup>2</sup> в день (день 1-й; 78% сеансов лейкафереза) с последующим назначением Г-КСФ, ГМ-КСФ или их ассоциации. Мобилизационный режим для больных с нейробластомой включал Циклофосфан по 3000 мг/м<sup>2</sup> в день, день 1 (34 сеанса; 27%) с обязательным последующим применением КСФ. Однако в большинстве случаев пациентам с нейробластомой для мобилизации ПСК применялся протокольный режим химиотерапии, включающий комбинацию из 4–5 химиопрепаратов. Протокол лечения саркомы Юинга предусматривал чередование 2 курсов ХТ и сбор ПСК в момент исчезновения микроскопически видимых метастазов из костного мозга. Поэтому ПСК у больных с этой нозологией были мобилизованы или сочетанием ифосфамида в дозе 2400 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1–5) и Вепезида по 100 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1–5; Ифо-ВП); или курсом САВ, включающим 48-часовую инфузию Адриамицином в дозе 70 мг/м<sup>2</sup>, Циклофосфан по 2100 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1–2), винкристин по 1,5 мг/м<sup>2</sup> в день (дни 1, 8, 15-й). Во всех случаях назначался один из КСФ. Другие химиотерапевтические режимы, включающие цисплатин, ифосфамид, Вепезид, Циклофосфан, Адриамицин в различных комбинациях, применялись перед сеансами лейкафереза у пациентов с солидными опухолями и гемобластомами. КСФ назначались подкожно или внутривенно на следующий день (д+1) после окончания ХТ у больных, включенных в исследование до ноября 1996 г. В этот период проведено 22 сеанса (3,7%). В качестве КСФ в подавляющем большинстве случаев (96%) назначался ГМ-КСФ, тогда как Г-КСФ в этой группе назначался только в 4% случаев. Факторы роста назначались подкожно или внутривенно на 3-й день от окончания ХТ (д+3) с ноября 1996 г. до марта 1997 г. Из 35 (5,9%) сеансов лейкафереза Г-КСФ и ГМ-КСФ назначались в этой группе в 58 и 42%, соответственно. В обеих группах ГМ-КСФ назначался в средней дозе 9,8 (5–12) мкг/кг в день, а Г-КСФ в средней дозе 5,3 мкг/кг в день (3,8–13). Введение гемопоэтических факторов роста продолжалось непрерывно до последнего дня лейкафереза включительно. После марта 1997 г. по настоящее время Г-КСФ назначался отсрочено в фазе восстановления кроветворения, после предварительно проведенного курса ХТ. Г-КСФ назначался в средней дозе 4,8 (3,4–12,8) мкг/кг в день с 18-го (8–41) дня от начала ХТ. Данный режим назначения Г-КСФ позволил точно прогнозировать время первого сеанса ЛФ, обеспечивал существенную экономию факторов роста и снижал частоту побочных явлений на фоне мобилизации.

В тех случаях когда Г-КСФ назначался в состоянии стабильного кроветворения без предварительной ХТ (36 сеансов), его средняя доза составила 5,7 (4,8–11,9) мкг/кг в день. Г-КСФ назначался 2 раза в день на 1–3-й дни, на 4-й день доза удваивалась.

#### **Критерии начала сеанса — сбор ПСК**

Сигналом для начала сбора являлось быстрое повышение уровня лейкоцитов ( $> 1,0 \times 10^9/\text{л}$ ) на фоне стабильного уровня тромбоцитов ( $> 50 \times 10^9/\text{л}$ ) или их быстрого подъема в фазе восстановления после ХТ. Показатель тромбоцитов  $50 \times 10^9/\text{л}$  не был строго детерминированным. Мы начинали сеанс, даже если показатель тромбоцитов находился ниже этого уровня, но динамика их повышения, как и динамика роста лейкоцитов, сроки, прошедшие от момента начала стимуляции КСФ, общее состояние больного указывали на возможность успешного проведения сепарации ПСК. Если мобилизационная ХТ не применялась, то для решения вопроса о времени начала сеанса опирались на уровень лейкоцитов  $> 10 \times 10^9/\text{л}$  и моноцитоз (MID-клетки)  $> 10\%$ . Естественно, уровень тромбоцитов здесь также играл существенную роль. Средний уровень тромбоцитов на момент сепарации составил 182 (11–782)  $\times 10^9/\text{л}$ , а лейкоцитов — 17,5 (0,9–109)  $\times 10^9/\text{л}$  среди всех больных серии. Относительно высокий лейкоцитоз на момент сепарации наблюдался за счет больных, получивших Г-КСФ (18,6 против 9,2  $\times 10^9/\text{л}$  среди больных, получивших ГМ-КСФ).

Перед началом процедуры больным, у которых не наблюдалось выраженной фазы аплазии кроветворения, и, как следствие, фаза выхода из цитопении была не четко выражена, или больным, которым не удалось собрать достаточное количество ПСК, опираясь на вышеописанные критерии, определялся уровень CD34+ [в среднем 0,98% (0,03–4,7) в периферической крови] — циркулирующих в периферической крови клеток на проточном флуоцитометре.

#### **Лейкаферез**

Сбор ПСК до марта 2000 г. осуществлялся на сепараторе крови Baxter CS-3000 plus с использованием программ Special 1 и 2. В качестве сепарационной применялась гранулоцитарная камера (Granulo), а в качестве коллекционной — камера малого объема (SVCC). В дальнейшем сборы ПСК осуществлялись на непрерывно-поточном сепараторе Cobe Spectra. Как забор, так и возврат осуществлялись через 2-просветный подключичный или бедренный венозный катетер (просвет на забор 14–16 G, на возврат — 16–18 G) в 94% ЛФ. При работе с центральным венозным катетером забор осуществлялся через центральный, а возврат — через периферический просветы. В 6% случаев в связи с неудовлетворительным дебитом одного из просветов катетера или у старших детей была катетеризована одна из периферических кубитальных вен. Для предупреждения окклюзии как центрального, так и периферического катетеров их просветы заполнялись раствором гепарина в концентрации 1000 Ед/1 мл в перерыве между сеансами ЛФ. В процессе сеанса ЛФ использовался стандартный раствор ACD-A, содержащий в одном литре раствора 24,5 г глюкозы, 22,0 г цитрата натрия, 7,3 г лимонной кислоты.

Коэффициент кровь/антикоагулянт ACD-A варьировал от 9:1 до 16:1. Это соотношение могло меняться в процессе сеанса сбора в зависимости от длительности процедуры, сосудистого доступа, диаметра катетера, переносимости поступления антикоагулянта в кровь и вязкости крови. Так, к примеру, если сеанс начинался при соотношении кровь/антикоагулянт 9:1, то ко второму часу ЛФ, особенно при наличии хотя бы малых симптомов гипокальциемии, это соотношение могло быть увеличено до 10:1–16:1. При проведении забора через периферическую вену соотношение кровь/антикоагулянт уменьшалось. Связь диаметра катетера с расходом антикоагулянта была обратно пропорциональной, т.е. чем меньше диаметр, тем больше коэффициент. В качестве профилактики цитратной интоксикации всем больным вводился глюконат кальция в дозе 150–250 мг/10 кг веса сразу после начала лейкофереза, затем каждый час. Та же доза глюконата кальция вводилась больному по требованию при возникновении симптомов гипокальциемии.

Сепарация продолжалась ежедневно до получения минимального суммарного количества CD34+ клеток в сепаратах более  $2,0 \times 10^6/\text{кг}$  или оптимального количества  $5,0 \times 10^6/\text{кг}$  веса больного и более. Больные получали факторы роста в течение всей серии сеансов до дня последнего сбора включительно. Факторы роста вводились не позже чем за 10 ч до сеанса сепарации.

#### **Особенности лейкофереза у детей с малым весом**

В начале исследования планировалось заполнять экстракорпоральный контур одноклассными донорскими эритроцитами всем детям, весившим менее 20 кг. Однако в процессе проведения работы, по мере накопления опыта мы пересмотрели этот критерий в сторону уменьшения. Так, мы всегда заполняли систему эритроцитарной массой у детей весом 12 кг и менее. В остальных случаях решение о заполнении принималось с учетом показателей гематокрита (менее 24%), уровня гемоглобина (менее 80 г/л), состояния ребенка, его объема циркулирующей крови (менее 1 л), предполагаемой длительности процедуры (более 2,5 ч). Таким образом, для детей с весом более 12 кг система заполнялась донорскими эритроцитами при наличии 2 и более вышеперечисленных факторов риска. Использовалась одноклассная донорская эритроцитарная масса, которую после определения групповой и индивидуальной совместимости по стандартным методикам разводили 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:1. Для детей весом 12–15 кг контур заполнялся 6% раствором гидроксиэтилкрахмала (Hydroxyethyl starch, HES).

У всех детей с малым весом процедуры проводились через 2-просветный катетер. Расчет конечного обработанного объема, выбор скорости процедуры, профилактика гипокальциемии проводились по вышеописанным схемам. Ни в одном случае не была применена медикаментозная седация. Родители находились с ребенком на протяжении всей процедуры.

#### **Лабораторные методы оценки качества собранного материала**

Собранный материал оценивался по двум параметрам: общему количеству ядерных клеток (ЯК) в сепара-

те и количеству CD34+-клеток на килограмм веса больного. Процент CD34+-клеток в клеточной суспензии, полученной в ходе цитафереза, определялся методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США). Использовались моноклональные антитела к CD34 анти-НРСА — 2 IgG1, меченные фикоэритрином (PE) (Becton Dickinson, США). В качестве контроля использовались PE-меченные мышиные IgG1 (Becton Dickinson, США).

#### **Статистические методы обработки материала**

Статистическая обработка материала осуществлялась на персональном компьютере Pentium 133MMX с использованием программ Microsoft Excel и Microsoft Access. Сравнение средних величин проводилось с использованием критерия «р» по тестам Стьюдента и Фишера.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Обобщенные результаты**

Всего проведено 592 сеанса лейкафереза. В среднем на одного больного пришлось 1,7 (1–5) сеансов. Средний объем крови, обработанный за сеанс, равен  $160 \pm 63$  (стандартная ошибка 7,1; доверительный интервал 95%) (38–320) мл/кг веса больного при средней скорости сеанса  $37 \pm 7,5$  (стандартная ошибка 0,9; доверительный интервал 95%) (15–40) мл/мин. Экстракорпоральный контур заполнялся донорскими эритроцитами в 8,8% случаев (52 сеанса), в 7,9% ( $n = 47$ ) — 6% раствором высокомолекулярного крахмала. В среднем за сеанс на одного больного собрано  $3,8 \pm 1,2$  (стандартная ошибка 0,13; доверительный интервал 95%) (0,1–22,7)  $\times 10^8$  ЯК/кг и  $3,4 \pm 3,6$  (стандартная ошибка 0,42; доверительный интервал 95%) (0,005–33,7)  $\times 10^6$  CD34+/кг. В связи с большим разбросом в объемах, обрабатываемых за сеанс, с целью стандартизировать результаты сбора нами введен такой синтетический показатель, как количество CD34+-клеток, собранных за сеанс на 1 кг веса больного при обработке одного объема циркулирующей крови (1 ОЦК) больного. В среднем нами было собрано  $1,6 \pm 1,9$  (стандартная ошибка 0,23; доверительный интервал 95%) (0,006–18,9)  $\times 10^6$  CD34+/кг 1 ОЦК.

Таким образом, при обработке за сеанс чуть больше чем 2 ОЦК нам потребовалось в среднем 2 лейкафереза для сбора дозы ПСК, оптимальной для аутотрансплантации. При средней скорости 34 мл/мин с учетом веса больного длительность сеанса не превышала 2,5 ч.

#### **Сравнительные результаты сепарации ПСК у детей весом менее (подгруппа А) и более (подгруппа В) 20 кг**

В подгруппе А проведено 184 сеанса сбора ПСК у 116 пациентов против 408 у 224 пациентов в подгруппе В. Среднее количество проведенных на одного больного сеансов равно 2 (1–5) в обеих подгруппах. Среднее количество тромбоцитов и лейкоцитов на момент начала первого лейкафереза в серии составило  $197,5$  (18–531)  $\times 10^{11}/л$  и  $16,5$  (0,9–57)  $\times 10^9/л$  против  $175$  (11–660)  $\times 10^{11}/л$  и  $18$  (0,9–63)  $\times 10^9/л$  в подгруппах А и В, соответственно ( $p = 0,05$  и  $p = 0,2$ ). Достоверные отличия обнаружены при анализе обработанного объема крови за сеанс и скорости сеанса. Эти показатели составили 180 (100–420) против 152 (50–300) мл/кг и 27 (10–50)

против 42,5 (20–70) мл/мин в подгруппах А и В, соответственно ( $p < 0,0001$  и  $p < 0,00001$ ). Что касается результатов сбора, то содержание ЯК и CD34+-клеток было сопоставимо в обеих группах и составило 4,8 (0,33–22,7) против 3,5 (0,1–14,4)  $\times 10^8$  ЯК/кг и 4,5 (0,1–28,5) против 2,9 (0,005–33,7)  $\times 10^6$  CD34+/кг в подгруппах А и В, соответственно ( $p = 0,00017$  и  $p = 0,015$ ).

При анализе стандартизированного показателя также не было выявлено достоверной разницы в подгруппах. На 1 ОЦК было собрано 2,2 (0,01–18,6) против 1,5 (0,006–18,9)  $\times 10^6$  CD34+/кг в подгруппе А и В, соответственно ( $p = 0,09$ ).

В обеих группах за сеанс лейкафереза в среднем было собрано более минимальной трансплантационной дозы CD34+-клеток. При этом не отмечалось достоверной разницы в количестве CD34+-клеток на 1 кг веса больного между группами. Достоверная разница в скорости сеанса ( $p < 0,00001$ ) объясняется объективной невозможностью проведения лейкафереза у маловесных детей на больших скоростях в связи с малым ОЦК, большим количеством антикоагулянта, попадающего в кровяной поток за единицу времени, плохим венозным доступом.

#### **Влияние уровня тромбоцитов и лейкоцитов периферической крови, определяемого на момент начала сеанса ЛФ, на количество ЯК и CD34+-клеток, собранных за сеанс**

Для выяснения корреляции между уровнем тромбоцитов в периферической крови и уровнем ЯК и CD34+-клеток в сепарате нами сформированы две группы с уровнями тромбоцитов на момент начала сепарации менее  $50 \times 10^{11}/л$  и более  $50 \times 10^{11}/л$ , соответственно. Всего в анализ включено 592 сеанса лейкафереза. В группе « $< 50\ 000$ » проанализировано 87 сеансов цитафереза, в группе « $> 50\ 000$ » — 505 сеансов. Средний уровень лейкоцитов и тромбоцитов на момент начала сепарации составлял  $17,5$  (0,9–52)  $\times 10^9/л$  и  $184$  (15–606)  $\times 10^{11}/л$ , соответственно. Уровень лейкоцитов в группе « $< 50\ 000$ » был ниже, чем в группе « $> 50\ 000$ » ( $11,3 \times 10^9/л$  против  $18,7 \times 10^9/л$ ;  $p = 0,00001$ ). Что касается результатов сепарации, то разница в уровне тромбоцитов не отразилась ни на количестве ЯК, ни на количестве CD34+-клеток. За сеанс на одного больного собрано  $2,8$  (0,2–15,4)  $\times 10^8$  ЯК/кг и  $2,8$  (0,14–24,3)  $\times 10^6$  CD34+/кг в первой группе против  $4,14$  (0,1–22,7)  $\times 10^8$  ЯК/кг и  $3,55$  (0,005–33,7)  $\times 10^6$  CD34+/кг во второй, соответственно ( $p < 0,00001$  и  $p = 0,29$ ).

Для оценки влияния уровня лейкоцитов на качество сепарата нами также были сформированы две группы с уровнем лейкоцитов  $< 10 \times 10^9/л$  и  $> 10 \times 10^9/л$ . В группе « $> 10\ 000$ » проанализировано 407 сеансов, а в группе « $< 10\ 000$ » — 185 сеансов. Средний уровень лейкоцитов на момент сепарации составил  $5,6$  (0,9–9,9) против  $22,6$  (10–70)  $\times 10^9/л$  в группах « $< 10\ 000$ » и « $> 10\ 000$ », соответственно.

Интересен тот факт, что уровень тромбоцитов был достоверно ниже в первой группе, чем во второй. Он составил  $115$  (12–460) против  $214$  (11–684)  $\times 10^{11}/л$ , соответственно ( $p < 0,00001$ ). Конечные обработанные объемы крови достоверно не различались между группами и составили 173 (38–428) против 154,5 (57–314) в первой

и второй группах, соответственно ( $p = 0,0008$ ). Разница в количестве лейкоцитов на момент сепарации сказалась на результатах достаточно неожиданным образом.

Количество ЯК достоверно различалось и составило 2,3 (0,01–15,4) против 4,7 (0,4–22,7)  $\times 10^8$ /кг в группах «< 10 000» и «> 10 000», соответственно ( $p < 0,00001$ ). Что касается количества CD34+-клеток, то здесь наблюдались достоверные отличия в пользу второй группы как в абсолютном их значении так и в стандартизованном показателе на 1 ОЦК. За сеанс на одного больного было собрано 2,5 (0,005–24,3) против 3,9 (0,02–33,7)  $\times 10^6$  CD34+/кг и 1,15 (0,006–18,9) против 1,93 (0,01–18,6)  $\times 10^6$  CD34+/кг 1 ОЦК в группах «< 10 000» и «> 10 000», соответственно ( $p = 0,0013$  и  $p = 0,002$ ).

Достоверные различия в уровне CD34+-клеток, собранных за сеанс, между группами больных с уровнем лейкоцитов более и менее  $10 \times 10^9$ /л не являются неожиданными, так как подобная корреляция наблюдалась в группах, мобилизованных Г-КСФ против ГМ-КСФ. Интересно, что между этими группами имеется достоверное различие в уровне тромбоцитов. Причем в группе с более высоким лейкоцитозом уровень тромбоцитов существенно выше (214 против  $115 \times 10^{11}$ /л;  $p = 0,0001$ ). Однако уровень тромбоцитов менее  $50 \times 10^{11}$ /л не сказывается на качестве сбора ПСК ( $p = 0,6$ ).

#### **Побочные эффекты и трудности при проведении ЛФ и меры по их преодолению**

За время проведения исследования нами не наблюдалось серьезных побочных эффектов, которые потребовали бы прекращения или приостановления сеанса лейкофереза. Такие симптомы гипокальциемии, как парестезии в кончиках пальцев, в периоральной зоне, чувство озноба, дискомфорт и умеренное двигательное возбуждение, наблюдались в 46% сеансов и легко купировались введением кальция глюконата в дозе 200–300 мг/10 кг веса однократно и/или уменьшением скорости введения антикоагулянта АСД-А. В 28% случаях требовались повторные введения кальция глюконата в тех же дозах. Артериальное давление рутинно измерялось перед сеансом лейкофереза и перед его окончанием, или при появлении симптомов гипокальциемии. Мы не наблюдали ни одного случая гипотонии даже при наличии симптомов гипокальциемии.

При заполнении экстракорпорального контура донорскими эритроцитами (52 сеанса) нами не отмечено аллергических или других реакций на трансфузию у больных, несмотря на реинфузию донорской крови со скоростью от 10 до 25 мл/мин (средний объем реинфузированной эритроцитарной массы 110 мл). Благодаря этой методике мы не наблюдали гемодинамических нарушений в ходе сеанса ни у одного из 29 больных с малым весом.

Что касается венозного доступа, то основной проблемой являлось частичное тромбирование катетера, что в свою очередь не позволяло осуществлять сеанс сбора ПСК из-за недостаточного тока крови на заборе или высокого сопротивления на возврате. Подобные проблемы возникали при положении катетера в центральной вене более 10–14 дней. В связи с этим мы либо осуществляли плановую замену катетера за 1–3 дня до начала сепарации,

заполняя его раствором гепарина в разведении 2500–5000 ед/мл, либо меняли катетер в ходе сеанса сепарации. В ходе сеансов сепарации мы не наблюдали признаков инфицирования центрального катетера ни в одном случае. Это может быть объяснено грамотным уходом за ним и тем, что количество сеансов сепарации в серии, при использовании поставленного накануне катетера, не превышало 4 (в среднем 2). Катетер с диаметром просвета 14/18 Ga не позволял проводить лейкоферез со скоростью больше 30 мл/мин, в среднем же скорость составляла 20–25 мл/мин. Проблема заключалась в невозможности осуществить возврат в процессе сеанса. Сепаратор, переполняясь кровью, выдавал сообщение о высоком давлении на выходе (Return Line Positive Pressure) и в конце концов останавливался. Оптимальным для сепарации на скорости до 40 мл/мин и даже 50 мл/мин у старших детей являлся катетер с просветами 16/16 Ga. Он обеспечивал устойчиво высокую скорость забора и адекватный возврат после отжима клеток. При проведении сеанса через периферические вены наблюдались боли по ходу катетеризованной вены без признаков флебита. Боли купировались самостоятельно на следующий день после окончания сеанса. При проведении нескольких сеансов с использованием периферического доступа у одного больного нами не ставился периферический катетер, а проводилась повторная пункция вен перед сеансом. Анализируя трудности и побочные явления ЛФ, следует отметить, что они не носили принципиального характера.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключении следует отметить, что при правильном выборе времени начала ЛФ, соблюдении протоколов сепарации, наличии хорошего венозного доступа сбор ПСК безопасен и эффективен у большинства больных, невзирая на предварительно проведенное лечение и малый вес. При неудачно проведенном сеансе не стоит отчаиваться, а необходимо повторить ЛФ, сменив протокол мобилизации и/или КСФ.

Очевидные преимущества, напрямую связанные с применением ПСК в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток, привели к тому, что в настоящее время в мире делается около 25–30 тыс. аутологичных трансплантаций ПСК в год. Из них около 25% приходится на больных в возрасте до 18 лет. Клиницистов привлекает, прежде всего, быстрота восстановления гемопоэза после реинфузии ПСК. Так, по сравнению с костным мозгом сроки восстановления лейкоцитов сокращаются на 5–8 дней, а тромбоцитов — на 3–6 дней. Привлекательны отсутствие общей анестезии для сбора ПСК, возможность проводить сеансы неоднократно, меньшая контаминация материала опухолевыми клетками. До настоящего времени нет единого мнения по поводу оптимальной схемы мобилизации ПСК в кровотоке. Наиболее часто применяется комбинация химиотерапии с последующим назначением гемопоэтических факторов роста, однако в ряде случаев, особенно в детской практике, может быть рекомендована схема мобилизации с включением только гемопоэтических факторов роста в фазе стабильного гемопоэза (steady state) [1, 5, 6]. Нерешенным остается вопрос о параметрах, определяю-

ших момент циркуляции максимального количества ПСК и обеспечивающих оптимальный сбор. Исходя из нашего опыта, можно рекомендовать схему отсроченного применения КСФ в фазе выхода пациента из химиоиндуцированной аплазии кроветворения. КСФ назначаются в период начала восстановления тромбоцитарного и лейкоцитарного ростков. Сбор осуществляется с 3–4-го дня назначения КСФ. При этом факторами, позволяющими предсказать высокий уровень CD34+ -клеток в сепарате, являются уровень мононуклеарных клеток в периферической крови, высокий, прогрессивно нарастающий лейкоцитоз на фоне применения КСФ и отсутствие снижения уровня тромбоцитов. Рутинное определение уровня циркулирующих CD34+ -клеток нецелесообразно, так как не всегда отражает истинную картину, но всегда задерживает начало сеанса ЛФ. Отсроченное применение КСФ позволяет планировать время начала сеанса ЛФ и не проводить его в выходные и праздничные дни, что позитивно сказывается на загрузке персонала отделения и лабораторий. Доза КСФ не оказывает влияния на результаты сепарации ПСК, т.к. в любом случае превышает физиологическую на несколько порядков. В своей практике мы назначаем КСФ в зависимости от их расфасовки, в дозировках, позволяющих минимизировать потери препарата.

Малый объем ОЦК у детей, а следовательно, риск возникновения гиповолемии, цитратной интоксикации, отсутствие хорошего венозного доступа, а подчас и контакта с пациентом представляют серьезные, но разрешимые проблемы. Во-первых, все исследователи, и мы в том числе, предпочитают проводить сеансы ЛФ на непрерывно-поточных сепараторах с максимально малым экстракорпоральным объемом [7, 8], заполнять систему донорски-

ми эритроцитами или высокомолекулярными растворами [7–10]. Основные критерии для решения вопроса о необходимости заполнения системы — вес и ОЦК пациента. Мы также заполняем экстракорпоральный контур либо эритроцитарной массой у детей весом менее 12 кг, либо высокомолекулярным крахмалом у пациентов с весом менее 15 кг.

Обеспечение хорошего сосудистого доступа также представляет проблему у детей. С одной стороны, необходимо обеспечить максимальную скорость проведения афереза, уменьшить соотношение кровь/антикоагулянт, с другой — нельзя забывать о комфорте больного, вынужденного проводить по несколько часов на сепараторе иногда несколько дней подряд. Оптимальным выходом может стать постановка двухпросветного центрального венозного катетера 16/16G в подключичную или бедренную вены. В ряде случаев сепарация проводится с использованием однопросветных центральных катетеров, поставленных перед проведением курса химиотерапии в комбинации с периферическим доступом. Такой подход имеет свои положительные стороны, однако затрудняет проведение длительных сеансов, особенно у маленьких и тревожных пациентов.

В настоящее время сбор ПСК является рутинной, управляемой и высокоэффективной процедурой у детей и подростков и может проводиться в специализированных учреждениях опытным персоналом при соблюдении стандартных протоколов и программ. Однако всегда следует помнить, что любая экстракорпоральная процедура, включая лейкоферез, требует тщательной подготовки пациента и медицинского персонала, строгого выполнения требований безопасности и может сопровождаться осложнениями.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kanold J., Hall P., Rapatel C. et al. Efficient and safe of PBSC collection in children. *Med Ped Oncol*. 1996; 4: 249.
2. Jantunen E., Kvalheim G. Mobilization strategies in hard-to-mobilize patients with lymphoid malignancies. *Eur J Haematol*. 2010; 85 (6): 463–71.
3. Damon L.E., Damon L. Mobilization of hematopoietic stem cell into peripheral blood. *Expert Rev Hematol*. 2009; 2 (6): 717–33.
4. Nussbaumer W., Schonitzer D., Trieb T., Fink F., Maurer-Dengg K. et al. Peripheral blood stem cell (PBSC) collection in extremely low-weight infants. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18: 15–7.
5. Масчан А., Богачёва Н., Скоробогатова Е. Применение гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в педиатрической практике. Опыт использования Ленограстима (Граноцит). *Педиатрия*. 1997; 4: 70–74.
6. Bensinger W., Appelbaum F., Rowley S., Storb R., Sanders J., Lilleby J., Gooley T., Demire T. et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *Journal of Clinical Oncology*. 1995; 13: 2547–55.
7. Urban C., Schwinger W., Beresch M. et al. Feasibility of peripheral blood stem cell and peripheral blood mononuclear cell separation in children with a body weight below 20 kg. *Med Ped Oncol*. 1997; 29: 115–20.
8. Alegre A., Diaz M.A., Madero L., Granda A., Vega de la A., Villa M. et al. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in children: a simplified single-apheresis approach. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 17: 923–7.
9. Demeocq F., Kanold J., Chassagne J., Bezou M.J., Lutz P., deLumley L., Philip I., Vannier J.P., Monqueritte G., Lamagner J.P. et al. Successful blood stem cell collection and transplant in children weighing less than 25 kg. *Bone Marrow Transplant*. 1994; 13: 43.
10. Takaue Y., Kawono Y., Abe T. et al. Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighing 20 kg or less. *Blood*. 1995; 86: 372–80.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Долгополов Игорь Станиславович**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения трансплантации костного мозга НИИ ДОГ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

**Адрес:** 115478, Москва, Каширское ш., д. 24, **тел.:** (499) 324-41-45, **e-mail:** irdolg@rambler.ru