

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 1996
УДК 006.04-089-089.843:612.28

*В. В. Птушкин, К. Л. Чимшикян, С. А. Тюляндин,
К. П. Лактионов, С. М. Портной, Д. М. Мхеидзе,
Л. Н. Буачидзе*

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ПОЛУЧЕННЫХ ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ G-CSF, У БОЛЬНЫХ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ПОСЛЕ ВЫСОКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

НИИ клинической онкологии

В последние годы не удалось достигнуть значительного повышения эффективности лечения большинства эпителиальных опухолей при использовании комбинаций химиопрепаратов в стандартных дозах. Даже при лечении таких наиболее чувствительных неоплазм, как лимфомы [12, 16] или герминогенные опухоли яичка [11], доля неизлеченных пациентов сохранялась относительно постоянной. Одним из препятствий оптимизации лечения является невозможность большего увеличения доз цитостатических препаратов вследствие их токсичности.

Существуют экспериментальные и клинические доказательства значимости величины дозы химиопрепаратов в противоопухолевом эффекте. Первые экспериментальные работы Н. Skipper на моделях животных [25] показали, что доля элиминируемых опухолевых клеток при стандартной дозе химиопрепарата является постоянной. Возможность полной эрадикации опухоли, таким образом, зависит от числа опухолевых клеток [10] и от противоопухолевой активности данной дозы препарата.

В клинике наличие зависимости доза — эффект также находит подтверждение. Непосредственные и отдаленные результаты терапии при лечении ряда химиочувствительных опухолевых заболеваний зависят от дозы введенных активных химиопрепаратов. К таким заболеваниям можно отнести некоторые гематологические злокачественные заболевания [17], опухоли молочной железы [3, 6], несеминозные герминогенные опухоли яичка [22], мелкоклеточный рак легкого и некоторые другие. Ограничением для повышения доз препаратов в большинстве случаев является миелотоксичность. Для ее преодоления в последние годы предложен ряд подходов. Использование гемопоэтических

CLINICAL INVESTIGATIONS

*V. V. Ptushkin, K. L. Chimishkyan, S. A. Tjulandin,
K. P. Laktionov, S. M. Portnoy, D. M. Mkheidze,
L. N. Buachidze*

AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF PERIPHERAL HEMOPOIETIC PROGENITOR CELLS AFTER G-CSF STIMULATION IN PATIENTS WITH SOLID TUMORS UNDERGOING HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY

Research Institute of Clinical Oncology

There was no considerable increase in efficacy of standard dose combination chemotherapy in treatment for most epithelial tumors over the recent years. The rate of treatment failure remains constant even for responsive neoplasms such as lymphomas [12, 16] and testicular germ cell tumors [11]. The progress in the efficacy is hindered in particular by impossibility further cytostatic dosage escalation due to high toxicity of the treatment.

There is experimental and clinical evidence of dose-dependence of antitumor effect of chemotherapy. The first experimental studies performed by H. Skipper [25] on animal models demonstrated that fraction of tumor cells eliminated as a result of standard dose chemotherapy was constant. Therefore, the possibility of complete tumor eradication depends on the number of tumor cells [10] and antitumor effect of the drug dose administered.

There is also clinical evidence of dose-response dependence. Both immediate and follow-up results of chemotherapy in some chemoresponsive neoplasms depend on dosage of active agents administered. These neoplasms include some hematological malignancies [17], breast tumors [3, 6], non-seminomatous testicular germ-cell tumors [22], small-cell lung carcinoma and some others. Dose limitation is mainly due to myelotoxicity. There are approaches to overcoming this limitation. For example, administration of hemopoietic growth factors reduces time of cytopenia and thus allows a 1.5-fold single dose escalation. The dosage may further be escalated if hemopoiesis is protected by transplantation of hemopoietic progenitor cells (HPC) from bone marrow as performed by the method of E. Thomas developed in the sixties [29].

This method has been modified considerably over

факторов роста, например, сокращает период цитопении, что позволяет повысить разовые дозы в 1,5 раза. Еще больше увеличить дозы можно при защите кроветворения трансплантацией клеток-предшественников гемопоэза (КПГ) из костного мозга по предложенной в 1960-х гг. Е. Thomas методике [29].

Данный метод за последнее время был значительно модифицирован. Применение факторов роста гемопоэза в посттрансплантационном периоде позволило сократить длительность гранулоцитопении и частоту инфекционных осложнений [18, 24, 27]. Разработка методов трансплантации КПГ из периферической крови, в особенности после стимулирования последних, позволила сократить также и период тромбоцитопении [20]. Эти методы дали возможность более безопасно осуществлять высокодозную химиотерапию и проводить такие курсы лечения повторно, особенно в не сверхвысоких, сублетальных для костного мозга дозах, без выраженной органной токсичности [5].

Методы трансплантации КПГ из периферической крови, разрабатываемые в последние годы, являются наиболее перспективными. Впервые способность таких клеток восстанавливать гемопоэз после летального облучения была показана Г. Brecher в 1951 г. [7, 14]. Были разработаны методы интенсификации высвобождения КПГ из эндотелиального депо костного мозга после воздействия химиопрепаратов [21], введения полианионов [30] или гемопоэтических факторов роста [26]. Из последних наибольшее применение в клинике нашли интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарный (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный (GM-CSF) факторы роста. При комбинировании методов стимулирования выброса КПГ в периферическое кровообращение обычно используют химиотерапию с последующим назначением G-CSF, GM-CSF или IL-3 [8, 13, 19]. В последние годы появились данные об использовании фактора стволовых клеток (c-cit) для увеличения выброса КПГ [2].

Интерес к получению КПГ периферической крови обусловлен отсутствием необходимости проводить общий наркоз (как при заборе костного мозга, по R. Storb [28]), возможностью получения достаточного количества материала при облучении или метастатическом поражении костей таза — основной области забора костного мозга и, что наиболее важно, более быстрым полным восстановлением показателей нормального гемопоэза по сравнению с таковыми показателями при трансплантации КПГ из костного мозга [23].

Цель настоящей работы — отработка метода получения КПГ периферической крови после стимулирования цитокинами и выявление их значимости в восстановлении гемопоэза после сверхвысокодозной химиотерапии.

Материалы и методы. У 3 пациентов (2 мужчины в возрасте 21 и 34 лет с диагнозом «рецидив несеминотной герминогенной опухоли яичка» и 1 женщины 39 лет с диагнозом «рак молочной железы», T4M2N0) было осуществлено получение стимулированных КПГ периферической крови после воздействия гранулоцитарного фактора роста (G-CSF — neupogen — «Hoffmann La-Roche», Швейцария).

Химиотерапия больных раком яичка проводилась по схеме СЕС — циклофосфан 150 мг/кг, этопозид 1500 мг/м² и карбоплатин 1600 мг/м². Ренифузию аутологичных криоконсервированных клеток-предшественников проводили на 4-й день после окончания хи-

the last years. Post-transplantational administration of hemopoietic growth factors reduced duration of granulocytopenia and frequency of infections [18, 24, 27]. Transplantation of peripheral blood HPC especially after their stimulation also led to reduction in thrombopenia time [20]. These methods increased safety of high-dose chemotherapy and allowed repeated cycles especially at under-superhigh doses that are sublethal for bone marrow and do not induce organic toxicity [5].

Methods of peripheral HPC transplantation that have appeared over the last years are the most promising. The ability of the progenitor cells to restore hemopoiesis after lethal irradiation was first demonstrated by G. Brecher in 1951 [7, 14]. The recent developments include enhancement of HPC release from bone marrow endothelial depot after chemotherapy [21], administration of polyanions [30] or hemopoietic growth factors [26]. Interleukin-3 (IL-3), granulocyte (G-CSF) and granulocyte-macrophage (GM-CSF) growth factors have been the most widely applied in the clinical practice. Combined methods of stimulation of HPC release into peripheral circulation mainly involve chemotherapy and G-CSF, GM-CSF or IL-3 administration to follow [8, 13, 19]. There are recent reports of utilization of a stem cell growth factor (c-cit) for enhancing the HPC release [2].

The deriving of HPC from peripheral blood is reasonable because it does not require general anesthesia (as in bone marrow taking according to R. Storb [28]), yields sufficient amount of material in cases undergoing irradiation or having metastases to pelvic bones that are the main source of bone marrow and, which is the most important, allows faster complete recovery of basic parameters of normal hemopoiesis as compared to transplantation of bone marrow HPC [23].

The purpose of this investigation was to study a methodology of deriving peripheral HPC after stimulation with cytokines and to evaluate HPC contribution to hemopoiesis recovery following superhigh dose chemotherapy.

Materials and Methods. Prestimulated peripheral HPC were taken from 3 patients (2 males aged 21 and 34 years with recurrent non-seminomatous germ-cell testicular cancer and 1 female aged 39 with T4M2N0 breast cancer) receiving granulocyte growth factor (G-CSF, neupogen, Hoffmann La-Roche, Switzerland).

The testicular cancer patients received chemotherapy by CEC schedule with cyclophosphamide 150 mg/kg, etoposide 1500 mg/m² and carboplatin 1600 mg/m². Reinfection of autologous cryopreserved progenitor cells was performed on day 4 following chemotherapy. The cycle was repeated after hemopoiesis recovery (leukocytes above 3,000 and platelets above 100,000) if there was no other than hematological toxicity.

The high-dose chemotherapy (HDC) for breast cancer was performed in the tandem-therapy mode, i.e. consisted in two different cycles with drugs free from cross resistance. Cycle 1 consisted of cyclophosphamide 150 mg/kg, etoposide 1500 mg/m² and platinidiam 170 mg/m² with autologous progenitor cell reinfection on day 4 following chemotherapy. The repeat cycle with mitoxantrone 50 mg/m² and cyclophosphamide 150 mg/kg was given after hemopoiesis recovery if there was no marked non-hematological toxicity. HPC reinfection was undertaken on day 5 following chemotherapy because of slow mitoxantrone elimination.

G-CSF, amgen (Hoffmann La-Roche, Switzerland) was administered in cases with normal hemopoietic functioning without pre-chemotherapy. The drug was given at 12 mcg/kg/d by 4 subcutaneous injections. Treatment duration was 6 days. Blood cell mononuclear

миотерапии. После восстановления нормальных показателей гемограммы (лейкоциты более 3000 и тромбоциты более 100 000) и при отсутствии признаков негематологической токсичности проводился повторный аналогичный курс.

Высокодозную химиотерапию (ВДХ) при раке молочной железы осуществляли по принципу «тандем-терапии», т. е. проводились два различных курса, включающих препараты с отсутствием перекрестной устойчивости. Первый курс включал циклофосфан 150 мг/кг, вепезид 1500 мг/м² и платидиам 170 мг/м² с реинфузией аутологичных клеток-предшественников на 4-й день после окончания химиотерапии. Повторный курс, включавший митоксантрон 50 мг/м² и циклофосфан 150 мг/кг, проводили после восстановления показателей гемопоэза и при отсутствии признаков выраженной негематологической токсичности. Реинфузию КПП осуществляли спустя 5 сут после окончания химиотерапии с учетом медленного выведения митоксантрона.

G-CSF-amgen (фирма «Hoffmann La-Roche», Швейцария) вводился при нормальной функции гемопоэза без предварительного введения химиопрепаратов. Введение осуществлялось в дозе 12 мкг/кг/сут в виде 4-кратной подкожной инъекции. Препарат вводился в течение 6 дней. На 5, 6 и 7-й дни осуществлялся забор мононуклеарной фракции клеток крови на сепараторе «Baxter CS-3000». В среднем при каждой процедуре забиралось $27 \cdot 10^9$ мононуклеаров ($15-56 \cdot 10^9$). После 3 сеансов сепарации было заготовлено соответственно $37, 42$ и $130 \cdot 10^9$ мононуклеарных клеток крови, что составило 0,5, 0,4 и $1,3 \cdot 10^6$ /кг.

На следующий день после последнего сеанса цитафереза в операционной под общим наркозом у больных путем многократных пункций в области задних верхних остей тазовых костей, по методике R. Storb [28], забиралась костномозговая взвесь. Количество мононуклеаров в полученном материале составило $20 \cdot 10^9$ и $34 \cdot 10^9$. У больной с опухолью молочной железы данная процедура проводилась до стимулирования G-CSF, и количество мононуклеаров составило $10,5 \cdot 10^9$.

Материал, полученный после цитафереза крови и пункционной аспирации костного мозга, обрабатывался, концентрировался и после введения ДМСО в конечной концентрации 5% замораживался, по разработанной в ОНЦ РАМН методике [1]. В последующем он хранился в парах жидкого азота.

Для точного установления роли периферических клеток-предшественников в восстановлении показателей гемопоэза было решено осуществить альтернативные трансплантации у одного и того же больного поочередно КПП из периферической крови, костного мозга или их сочетания.

Все пациенты на время лечения были помещены в изолированные стерильные палаты с постоянным положительным давлением воздуха, поступающего через НЕРА-фильтры. Всем им проводилась антиконтаминационная терапия, включавшая прием ципрофлоксацина (цифрана) в дозе 500 мг/сут и кетоконазола (низорала) в дозе 400 мг/сут. До начала деконтаминации делались посевы из носа, зева и прямой кишки. При обнаружении в бактериальном посеве роста грибов применялись неабсорбирующиеся противогрибковые препараты (леваридон). При повышении температуры выше 38° С в период лейкопении больным делался посев крови, а при признаках поражения других систем — соответственно мочи, кала и др. После снижения количества гранулоцитов крови ниже 1000/мкл доза ципрофлоксацина увеличивалась до 1000 мг/сут, ниже 400/мкл добавлялся цефобид в дозе 6 г/сут. При возникновении фебрильной лихорадки после посева назначалась эмпирическая парентеральная антибиотикотерапия с использованием препаратов широкого спектра действия при учете результатов предварительного бактериологического исследования.

Гемопрепараты для заместительной терапии вводились по показаниям после предварительного облучения (1,5 Гр).

Результаты. У 3 больных было проведено по 2 курса ВДХ. Интервалы между курсами составили 22—40 дней. Переносимость химиотерапии была вполне удовлетворительной. Применение циклофосфана и этопозиды в сочетании с препаратами платины сопровождалось тошнотой и рвотой II—IV степени, более выраженными у пациентов, получавших препараты платины ранее. Также отмечалось кратковременное преходящее увеличение креатинина у 1 пациента и мукозит у всех боль-

fraction was derived by separation using a Baxter CS-3000 apparatus on days 5, 6, 7. Average yield was $27 \cdot 10^9$ mononuclears ($15-56 \cdot 10^9$) per procedure. We had 37, 42 and $130 \cdot 10^9$ mononuclear cells, i. e. 0.5, 0.4 and $1.3 \cdot 10^6$ /kg, respectively, after 3 separation procedures.

On the day after the last cytapheresis session the patients underwent multiple bone marrow aspiration from pelvic posterior upper spines according to R. Storb [28] performed under general anesthesia in an operating room. The mononuclear takes were $20 \cdot 10^9$ and $34 \cdot 10^9$ cells. In the breast cancer patient the procedure was carried out before stimulation with G-CSF to give $10.5 \cdot 10^9$ mononuclears.

Material obtained as a result of blood cytapheresis and bone marrow aspiration was processed, concentrated and, after addition of DMSO at a final concentration 5%, frozen according to the method developed at CRC RAMS [1] to be stored in liquid nitrogen vapor.

In order to evaluate contribution of peripheral progenitors in hemopoiesis recovery more accurately we performed in turn alternative transplantations of HPC from peripheral blood, bone marrow or of their combination in one and the same patient.

During treatment all the patients stayed in isolated sterile wards with constant positive pressure of HEPA-filtered air. Every patient underwent anticontamination therapy with ciprofloxacin (cifrane) at 500 mg/d and ketoconazol (nisoral) at 400 mg/d. Cultures from the nose, throat and rectum were studied microbiologically before decontamination. In case of fungi-positive tests the patients received non-absorbed antifungal drugs (levaridin). In fever above 38° C during leukopenia blood culture was taken, in signs of other systemic disturbances urinal, fecal or other relevant cultures were studied. After granulocyte fall below 1000/mcl the cyclofloxacin dose was escalated to 1000 mg/d, and in the drop below 400/mcl cefobid 6 g/d was given. Patients with febrile fever were given broad range antibiotics parenterally as prescribed empirically with due account of the microbiological findings.

Replacement therapy with the hemopreparations was given by indications after pre-irradiation at 1.500 Gy.

Results. The 3 patients received 2 HDC cycles each. Intercycle intervals were 22 to 40 days. Chemotherapy tolerance was satisfactory. Therapy with cyclophosphamide and etoposide in combination with platinum derivatives was accompanied by grade II-IV nausea and vomiting more marked in patients with a history of previous platinum therapy. Other toxicities were a short-term transient rise in creatinine in 1 case and mucositis in all the patients observed in parallel with grade II-III enteropathy requiring parenteral alimentation during 3 of 5 cycles.

Effective hemopoiesis recovery was achieved in 5 of the 6 HDC cycles. Peripheral blood HPC alone (1 cycle) and in combination with bone marrow progenitors (3 cycles) were administered in 4 cases. After 2 HDC cycles the reinfection was performed with bone marrow cell only. One patient died during a chemotherapy cycle by day +25 due to infection and toxicity in the absence of hemopoiesis recovery.

After peripheral blood HPC transplantation leukocyte recovery above 500 per mcl was observed on day 9.5 (9-11) at the average. There was no significant difference in recovery time after administration of peripheral blood HPC alone or in combination with bone marrow cells (fig.1). The mean recovery time after bone marrow HPC administration was 21 (17-24) days. In one patient the leukocyte count 500 was achieved at 17 days after reinfection, and one patient died on day 25 following reinfection due to infection and toxicity with no signs of effective hemopoiesis recovery.

Platelet recovery above 20,000 was observed after peripheral HPC transplantation with and without bone marrow cells at 11 (9-13) days on the average (fig.1).

ных, сопровождавшийся энтеропатией II—III степени с назначением парентерального питания в 3 курсах из 5.

Эффективное восстановление гемопоэза было получено в 5 из проведенных 6 курсов ВДХ. В 4 случаях вводились КПГ периферической крови (1 курс) и в сочетании с костномозговыми клетками-предшественниками (3 курса). После 2 курсов ВДХ реинфузировали только костномозговые клетки. В одном из них к 25-му дню больная погибла от инфекционно-токсических осложнений при отсутствии эффективного восстановления гемопоэза.

Восстановление количества лейкоцитов свыше 500 в 1 мкл было отмечено после трансплантации КПГ периферической крови в среднем через 9,5 (9—11) дней. Не было значительного отличия в сроках между восстановлением после введения КПГ только периферической крови или в сочетании с костномозговыми (рис. 1). При введении КПГ из костного мозга этот срок составил в среднем 21 день (17—24 дня). В одном случае больной достиг уровня 500 лейкоцитов через 17 дней, в другом — больная умерла от инфекционно-токсических осложнений на 25-й день после реинфузии без признаков эффективного восстановления гемопоэза.

Начало восстановления числа тромбоцитов выше 20 000 отмечалось после трансплантации КПГ периферической крови совместно с костномозговыми клетками или без них в среднем через 11 (9—13) дней (см. рис. 1). Также не было отмечено различия между длительностью тромбоцитопении после КПГ периферической крови с костномозговыми клетками или без них у 1 больного (9 и 10 дней соответственно). Аналогичный период после реинфузии костного мозга составил в среднем не менее 21 (18—24) дня.

Длительность периода лейкопении ниже 500 клеток в 1 мкл составила для случаев трансплантации с КПГ периферической крови в среднем 10,5 (9—12) дней, а для случаев трансплантации КПГ только костного мозга в среднем 20 (17—24) дней (рис. 2). Длительность тромбоцитопении ниже 20 000 клеток в 1 мкл составляла у пациентов, получавших КПГ периферической крови, в среднем 8,5 (7—11) дней, и у пациентов, не получавших этих клеток при трансплантации, 20 (17—24) дней (рис. 3, а, б).

Параллельно длительности тромбоцитопении снижалась и потребность в трансфузии тромбоконцентрата. При использовании КПГ периферической крови на каждого пациента было израсходовано в среднем 8 ед. (4—10) тромбоцитов, а при альтернативных курсах — 20.

Повышение температуры выше 38°С и инфекционные осложнения в период цитопении имели место только у двух пациентов, не получавших стимулированные КПГ из периферической крови. В одном из этих случаев наблюдалось нагноение постоянного подключичного катетера, а во втором отмечались пневмония и подкожные очаги септического характера.

У первого пациента назначение второй схемы антибиотиков, включавшей пиперацillin, ампициллин и гентамицин, позволило нормализовать температуру в течение 2 сут. Во втором случае аналогичный эффект был достигнут при назначении ванкомицина с амикаци-

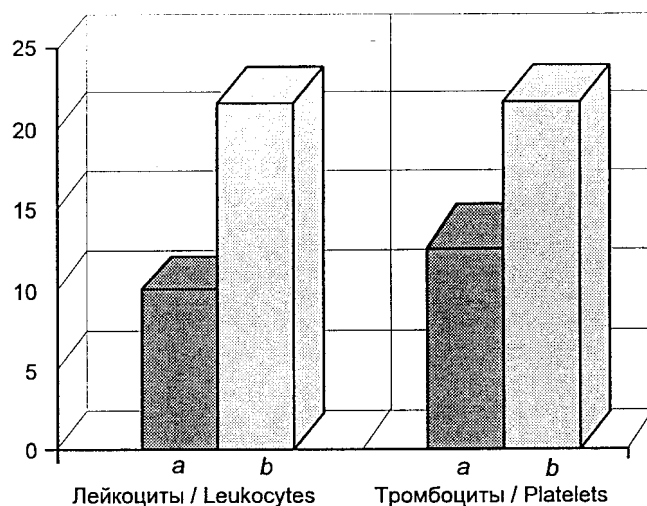


Рис. 1. Сроки начала восстановления количества лейкоцитов свыше 500 клеток и тромбоцитов свыше 20 000 клеток в 1 мкл после трансплантации КПГ периферической крови (а) и костного мозга (б).

По вертикали — количество дней до начала восстановления лейкоцитов и тромбоцитов. Здесь и на рис. 2 по горизонтали — состояние лейкоцитов и тромбоцитов после трансплантации костного мозга и периферических стволовых клеток.

Fig. 1. Recovery time of leukocytes above 500 and platelets above 20,000 per mcl following transplantation of peripheral blood (a) and bone marrow (b) HPC.

Numerals on the vertical show days till leukocyte and platelet recovery. Here and in fig. 2 letters on the x axis mark leukocytes and platelets after bone marrow and peripheral trunkal cell transplantation.

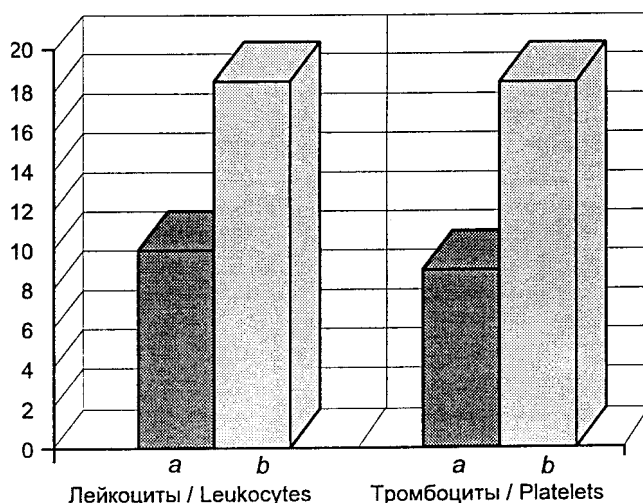


Рис. 2. Длительность периода лейкопении ниже 500 клеток и тромбоцитопении ниже 20 000 клеток в 1 мкл при трансплантации КПГ периферической крови (а) и костного мозга (б).

По вертикали — количество дней, когда уровень лейкоцитов и тромбоцитов сохранялся ниже критического (500 и 20 000 клеток в 1 мкл соответственно).

Fig. 2. Durations of leukopenia below 500 and thrombocytopenia below 20,000 per mcl following transplantation of peripheral blood (a) and bone marrow (b) HPC.

Numerals on the vertical show days when leukocyte and platelet levels were below critical (500 and 20,000 per mcl, respectively).

ном, однако через 5 дней температура повысилась повторно и отмечалась лишь кратковременная стабилизация после назначения тиама. Введение амфотерицина В осложнилось развитием почечной недостаточности, на фоне которой прогрессировала недостаточность кровообращения по бивентрикулярному типу, что привело к гибели больной.

Эффективность ВДХ в данном исследовании была высокой. У обоих пациентов с герминогенными опухолями яичка уже после первого высокодозного курса нормализовались маркеры и было отмечено уменьшение метастазов в забрюшинные лимфоузлы. Повторное лечение привело к их полному исчезновению, что было подтверждено при лапаротомии.

Обсуждение. Данное исследование ставило своей целью выявить роль стимулированных КППГ из периферической крови в восстановлении гемопоэза после сверхвысокодозной химиотерапии, полностью выключающей костный мозг. Полученные первые результаты свидетельствуют об их способности сократить период цитопении по сравнению с костномозговыми КППГ, что значительно сокращает риск инфекционных и геморрагических осложнений, уменьшает потребность в антибиотиках. Также уменьшается количество дней, проведенных пациентами в изолированной палате и в стационаре.

В нашем исследовании не было отмечено значительного отличия у одного и того же больного в длительности цитопении после трансплантации только КППГ периферической крови или их комбинирования с КППГ костного мозга. Так, применение только КППГ периферической крови сопровождалось даже несколько более коротким периодом восстановления, чем их применение у того же больного в комбинации с клетками костного мозга. Во всех случаях период цитопении был наиболее коротким при трансплантации периферических КППГ.

Восстановительный период при применении КППГ костного мозга без добавления клеток периферии был более длительным и сопровождался большим количеством осложнений. У первого пациента с герминогенной опухолью яичка в период цитопении после второго курса ВДХ были отмечены и инфекционные, и геморрагические осложнения. При применении КППГ периферической крови в двух курсах у одного пациента не было отмечено отличия в длительности цитопении.

Полученные данные сходны с результатами ранее проведенных аутологичных трансплантаций КППГ костного мозга после аналогичных химиотерапевтических курсов в нашем отделении. Средний период лейкопении ниже 500 клеток в 1 мкл составил у 10 больных в среднем 17 (9—32) дней, а тромбоцитопения ниже 20 000 длилась около 16 (10—30) дней.

Переносимость G-CSF была удовлетворительной. Один больной на 5-й день введения препарата предъявлял жалобы на головные боли и небольшую тошноту на фоне высокого содержания лейкоцитов крови (40 000 клеток в 1 мкл), которые прекратились после первого сеанса цитафереза и более не возобновлялась. Изменений биохимических показателей крови практически не наблюдалось.

Переносимость цитафереза была хорошей, хотя

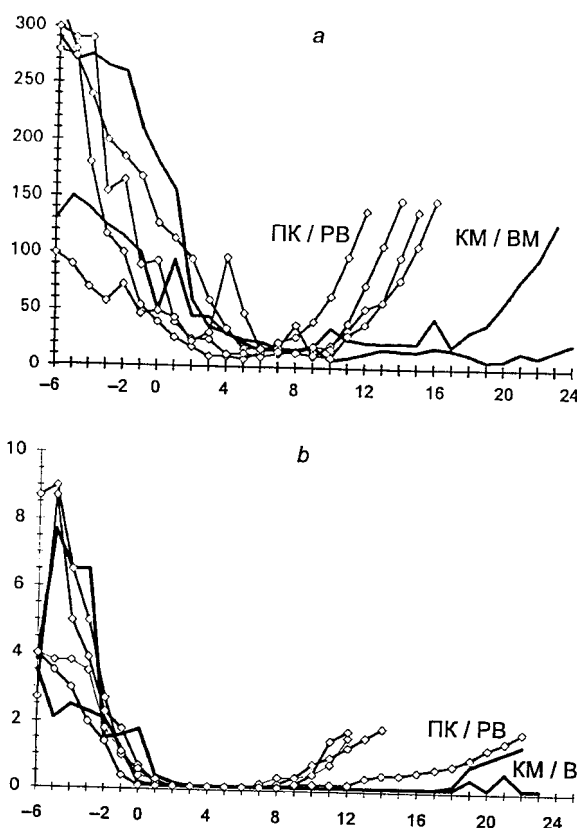


Рис. 3. Динамика содержания тромбоцитов (а) и лейкоцитов (б) крови после трансплантации КППГ периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ).

По горизонтали — количество дней (день 0 — трансплантация аутологичных КППГ костного мозга и периферической крови).

Fig. 3. Changes in platelet (a) and leukocyte (b) counts following transplantation of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) HPC.

Numerals on the x axis show the number of days (day 0, transplantation of bone marrow and peripheral blood HPC).

There was no difference in thrombopenia duration after peripheral blood and bone marrow HPC transplantations in 1 patient (9 and 10 days, respectively). The mean thrombopenia time after bone marrow reinfusion was 21 (18-24) days.

Mean duration of leukopenia below 500 per mcl after peripheral HPC was 10.5 (9-12) days while after transplantation of bone marrow HPC this term was 20 (17-24) days (fig.2). Mean duration of thrombopenia less than 20,000 per mcl was 8.5 (7-11) days after peripheral HPC transplantation and 20 (17-24) days after transplantation without peripheral HPC (fig.3, a, b).

The need in thrombocyte infusion was decreasing in parallel with thrombocytopenia duration. Mean amount of platelets was 8 (4-10) units per patient receiving peripheral blood HPC and 20 per patients receiving alternative treatment.

Fever above 38° C and infection were detected during cytopenia in 2 patients who did not receive stimulated

у одного больного отмечались слабость и мышечные подергивания на фоне процедуры, исчезнувшие после введения препаратов кальция.

В настоящее время интенсивно развиваются методики использования различных стимуляторов ранних клеток-предшественников гемопоэза. Это позволяет при достаточном их количестве максимально сократить период цитопении после ВДХ, а с другой — использовать методики очистки от опухолевых клеток, приводящие к потере части полученного материала.

При рассмотрении имеющихся в настоящее время результатов применения стимулированных КПП периферической крови для защиты гемопоэза после ВДХ следует отметить, что период восстановления, по данным различных авторов, длится не менее 9—11 дней [27]. Данный факт некоторые исследователи объясняют наименьшей повреждаемостью ранних предшественников гемопоэза при криоконсервации.

В последние годы в клиническую практику вводят методики трансплантации стимулированных клеток-предшественников без замораживания, а также их стимулирование вне организма больного. Это стало возможным после разработки методов поддержания краткосрочной культуры КПП. Данная методика позволяет получать значительное количество клеток-предшественников более поздних генераций при их стимулировании *in vitro* с различными комбинациями цитокинов [15]. Хорошие результаты, в частности, получены при сочетании 6 из них: IL-1, IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF и G-CSF. Данная система цитокинов позволяет добиться 500—1000-кратного увеличения клеточности за 12—16 дней, т. е. периода, вполне достаточного для проведения курса ВДХ и удаления цитостатиков из организма. Большинство из клеток, полученных в данной культуре (60—70%), — это промиелоциты и миелоциты, а 15—20% относятся к мегакариоцитарному ростку, что позволяет надеяться на хороший эффект в преодолении гранулоцито- и тромбоцитопении. Получены первые клинические результаты таких трансплантаций.

Возможность почти полной ликвидации периода цитопении и связанных с ней осложнений имеет большое значение в клинике, важным также является значительное удешевление самой процедуры получения достаточного количества КПП при использовании методик культивирования стволовых клеток *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мхеидзе Д. М. // А.с. № 1635332 от 15 ноября 1990 г.
2. Andrews R. G., Bensinger W. I., Knitter G. H. et al. // Blood. — 1992. — Vol. 80. — P. 2715—2720.
3. Antman K. H., Ayash L., Elias A. et al. // J. clin. Oncol. — 1992. — Vol. 10. — P. 102—110.
4. Bender J. G., To L. B., Williams S. et al. // J. Hematother. — 1992. — Vol. 1. — P. 329—342.
5. Bokemeyer C., Schmoll H. J. // Europ. Urology. — 1993. — Vol. 23. — P. 223—230.
6. Bonadonna G., Valagussa P. // New Engl. J. Med. — 1981. — Vol. 304. — P. 10—15.
7. Brecher G., Cronkite R. P. // Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.). — 1951. Vol. 77. — P. 292.

HPC from peripheral blood. One of these cases presented with suppuration of the permanent subclavicular catheter, and the other with pneumonia and subcutaneous sepsis.

Antibiotic therapy with piperacillin, ampicillin and gentamycin led to temperature normalization at 2 days in the first case. A similar effect was achieved in the other patient by administration of vancocin with ampicillin, however hyperthermia repeated 5 days later, and therapy with thienam caused but short-term stabilization. Administration of amphotericin B was accompanied with renal failure and progression of biventricular circulation failure which caused the patient's death.

HDC efficacy was high in our study. Both patients with germ-cell testicular tumors demonstrated marker normalization and reduction in retroperitoneal lymph node metastases. The repeat cycle led to complete disappearance of the metastases confirmed by laparotomy.

Discussion. This study (which is currently in progress) is to evaluate contribution of peripheral blood pre-stimulated HPC into hemopoiesis recovery after superhigh dose chemotherapy that is completely fatal for bone marrow. The first interim results suggest that this treatment leads to reduction in cytopenia duration as compared to infusion of bone marrow HPC and therefore to decrease in the risk of infection and hemorrhage, to lower antibiotic consumption. It also reduces the patients' stay in isolated wards and in the hospital.

We found that one and the same patient had different cytopenia durations after transplantation of peripheral HPC alone and in combination with marrow HPC. Administration of peripheral HPC alone led to reduction in recovery time as compared to that following combined infusion of peripheral blood and bone marrow HPC in the same patient. Cytopenia duration was shorter following peripheral HPC transplantation in all the cases.

The time till recovery was longer and the rate of morbidity was greater following infusion of bone marrow HPC without peripheral cells. One patient with germ-cell testicular cancer had both infection and hemorrhage during cytopenia following cycle II HDC. There was no difference in cytopenia duration following 2 cycles of peripheral HPC infusion in another patient.

Our findings support previous results of autologous transplantation of bone marrow HPC following similar chemotherapy performed at our department. Mean time of leukopenia below 500 per mcl in 10 patients was 17 (9-32) days, and thrombocytopenia below 20,000 lasted 16 (10-30) days on the average.

G-CSF tolerance was satisfactory. One patient had headache and mild nausea while having high leukocyte level (40,000 per mcl) on day 5, the symptoms disappeared after the first session of cytopheresis and did not repeat. There were practically no changes in blood chemistry.

Cytopheresis tolerance was good though one patient presented with weakness and convulsions during the procedure which were countered by calcium therapy.

8. Brugger W., Bross K., Frish J. et al. // *Blood*. — 1992. — Vol. 79. — P. 1193—1200.
9. Cohen M. N., Creaven P. J., Fossieck C. et al. // *Cancer Treat. Rep.* — 1977. — Vol. 61. — P. 349—354.
10. DeVita V. T. // *Cancer Principles and Practice of Oncology*. — Philadelphia, 1989. — P. 276—300.
11. Einhorn L. H., Crawford E. D., Shipley W. U. et al. // *Ibid.* — P. 1071—1089.
12. Gaynor E. R., Ultmann J. E. // *New Engl. J. Med.* — 1984. — Vol. 311. — P. 1506—1508.
13. Gianni A. M., Siena S., Bregni M. et al. // *Lancet*. — 1989. — Vol. 2. — P. 580—585.
14. Goodman J. W., Hodgson G. S. // *Blood*. — 1962. — Vol. 19. — P. 702—714.
15. Haylock D. N., To L. B., Dowse T. L. et al. // *Ibid.* — 1992. — Vol. 89. — P. 1405—1412.
16. Horning S. G., Rosenberg S. A. // *New Engl. J. Med.* — 1984. — Vol. 311. — P. 1471—1475.
17. Lepage E., Gisselbrecht C., Haioun C. et al. // *Blood*. — 1992. — Vol. 80 (Suppl. 1). — P. 158.
18. Peters W. P., Kurtzberg J., Atwater S. et al. // *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.* — 1989. — Vol. 8. — P. 702A.
19. Pettengell R., Demuyne H., Testa N. G. et al. // *J. Cell. Cloning*. — 1992. — Vol. 10. — P. 59—61.
20. Peterson J., Kirkpatrick G., Ross M. et al. // *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.* — 1991. — Vol. 10. — P. 78.
21. Richman C. M., Weiner R. S., Yankee R. A. // *Blood*. — 1976. — Vol. 47. — P. 1031—1039.
22. Samson M. K., Rivin S. E., Jones S. E. et al. // *Cancer (Philad.)*. — 1984. — Vol. 53. — P. 1029—1035.
23. Sheridan W. P., Begley C. G., Jutther C. A. et al. // *Lancet*. — 1992. — Vol. 339. — P. 640—644.
24. Sheridan W. P., Morstin G., Wolf M. et al. // *Ibid.* — 1989. — P. 891—895.
25. Skipper H. E. // *Cancer Res.* — 1967. — Vol. 27. — P. 2636—2645.
26. Sokinski M. A., Cannistra S. A., Elias A. et al. // *Lancet*. — 1988. — Vol. 1. — P. 1194—1198.
27. Taylor K. M., Jagannath S., Spitzer G. et al. // *J. clin. Oncol.* — 1989. — Vol. 7. — P. 1791—1799.
28. Thomas E. D., Storb R. // *Blood*. — 1970. — Vol. 36. — P. 507—515.
29. Thomas E. D., Storb R., Clift R. A. // *New Engl. J. Med.* — 1975. — Vol. 292. — P. 832.
30. Zander A. R., Spitzer G., Verma D. S. et al. // *Exp. Hematol.* — 1980. — Vol. 8. — P. 521—525.

Поступила 14.04.94 / Submitted 14.04.94

© Коллектив авторов, 1996
УДК 616-006.34-07:612.018

Н. Е. Кушлинский, О. И. Костылева, А. А. Радченко,
Е. С. Герштейн, Н. А. Макрецов, М. Д. Алиев

РЕЦЕПТОРЫ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА, ЭСТРОГЕНОВ И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В ПЕРВИЧНЫХ ОПУХОЛЯХ КОСТЕЙ

НИИ клинической онкологии

Несмотря на постоянное совершенствование медикаментозного и хирургического лечения, злокачественные опухоли костей продолжают отличаться тяжестью течения, низкой чувствительностью к терапии, ранним метастазированием. Неудовлетворительные результаты терапии сарком костей убедительно свидетельствуют о необходимости глубокого изучения механизмов их роста и метастазирования с целью поиска дополнительных прогностических факторов и новых подходов к их лечению. Для злокачественных опухолей характерно нарушение регуляции пролиферативных процес-

Application of various agents for stimulation of early hemopoiesis progenitors is currently in progress. This allows reduction in cytopenia duration following HDC, on the one hand, and utilization of methods for tumor cell clearing leading to partial loss of the material, on the other.

Analysis of reports on the use of stimulated peripheral HPC for hemopoiesis protection following HDC shows that the recovery lasts 9-11 days or more [27]. In the opinion of some investigators this is because early hemopoiesis progenitors suffer less damage from cryopreservation.

Transplantation of stimulated progenitor cells without prefreezing as well as their stimulation outside the patient's body have recently been implemented in the clinical practice. This became possible after development of methods for maintenance of short-term HPC culture. These methods give a large yield of progenitors of later generations after their *in vitro* stimulation with various cytokine combinations [15]. Good results are obtained with combinations of 6 cytokines: IL-1, IL-3, IL-6, CSF, GM-CSF and G-CSF. This cytokine system gives a 500-1000-fold rise in cell count for 12-16 days, i.e. the period sufficient for performance of one HDC cycle and cytostatic clearance from the body. Cells in this culture are mainly promyelocytes and myelocytes (60-70%), while 15-20% are megakaryocytes which is good for countering granulo- and thrombopenia. First clinical results of such transplantations have recently been reported.

The possibility of complete elimination of cytopenia and associated morbidity is of great clinical importance. The *in vitro* culture of stem cells giving a sufficient HPC yield allows a significant reduction in treatment cost which is also of much importance.

N. E. Kushlinsky, O. I. Kostyleva, A. A. Radchenko,
E. S. Gershtein, N. A. Makretsov, M. D. Aliev

ESTROGEN, GLUCOCORTICOID AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS IN PRIMARY BONE TUMORS

Research Institute of Clinical Oncology

In spite of continuous improvement in the therapy and surgery malignant bone tumors still show severe course, low response to therapy and early metastasizing. The unsatisfactory results of therapy for bone sarcoma prove necessary profound study of mechanisms of tumor growth and metastasizing as well as search for additional prognostic factors and new approaches to the treatment. Malignant tumors are characterized by disorder in regulation of proliferation and by uncontrolled cell growth. Besides, there is a change in cell sensitivity to growth factors that are produced by the tumor cells (autocrine