

ОПЫТ МОБИЛИЗАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ CD34+ КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

*К. Д. Капланов, Л. С. Трегунова, С. В. Егоров, Т. Ю. Клиточенко,
И. В. Матвеева, К. С. Момотюк, А. Л. Шипаева*

Волгоградский областной клинический онкологический диспансер № 1

Проведена оценка эффективности CD34-позитивных клеток у пациентов с миеломной болезнью, которые получали лечение по программе PAD (бортезомиб, адриабластин, дексаметазон). Как только лечение было закончено, пациентов подвергали повторному обследованию. Три пациента с полной или хорошей частичной ремиссией получали высокие дозы циклофосфамида. Затем их костный мозг стимулировали G-CSF, и были собраны CD34-позитивные клетки. Во всех трех случаях количество CD34-позитивных клеток было достаточным для трансплантации и репопуляции костного мозга. Подсчет и хранение CD34-позитивных клеток при криогенной температуре проводились в Национальном гематологическом центре (Москва). Результаты данной работы важны для введения программ интенсивного лечения гемоонкологических пациентов.

Ключевые слова: миеломная болезнь, высокодозная терапия, стволовые кроветворные клетки, аутологичная трансплантация, бортезомиб («Велкейд»).

AN ATTEMPT TO MOBILIZE AUTOLOGOUS PERIPHERAL STEM HEMOPOIETIC CD34+ CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

*K. D. Kaplanov, L. S. Tregubova, T. Yu. Klitochenko,
I. V. Matveeva, K. S. Momotiuk, A. L. Shipaeva*

The effectiveness of the CD34-positive cell harvesting in multiple myeloma patients treated with four courses of PAD (bortezomib, adriablastin, dexametasone) was evaluated. As soon as treatment was finished patients were reevaluated. Three patients who had achieved complete or good partial remission received high-doses of cyclophosphamide. Then their bone marrow was stimulated with G-CSF and CD34-positive cells were collected. In all three cases the number of CD34-positive cells harvested was enough for transplantation and bone marrow repopulation. CD34-positive cells counting and cryopreservation were performed in National Centre for Hematology [Moscow]. The results of this work are crucial for introduction of modern programs of intensive treatment of hematooncological patients.

Key words: multiple myeloma, high-dose therapy, hemopoietic stem cells, autologous transplantation, bortezomib (Wellcaid).

Высокодозная химиотерапия [ВДТ] под прикрытием трансплантации аутологичных стволовых кроветворных CD34+ клеток широко применяется в онкогематологии при лечении миеломной болезни в случае неблагоприятного течения лимфогранулематоза и агрессивных неходжкинских лимфом на фоне терапии первой линии, а также в клинике острых лейкозов для закрепления (консолидации) полной ремиссии при невозможности проведения аллогенной трансплантации костного мозга [1].

Данное направление химиотерапии находит также место при лечении рассеянного склероза и некоторых солидных новообразований [1—3].

На развитие ВДТ большое влияние оказало появление в 80-х гг. XX века рекомбинантных форм гемопоэтических цитокинов — гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и улучшение методов автоматического лейкофереза за счет совершенствования сепараторов клеток крови. При необходимости аутологичной трансплантации заготовка стволовых кроветворных клеток (СКК) из периферической крови имеет преимущества в сравнении с забором и консервацией костного мозга. Клеточность

костного мозга может быть снижена, а также возможна его инфильтрация опухолевыми клетками. Кроме того, сбор СКК посредством сепаратора из периферической крови лучше переносится пациентами [2].

Резкое возрастание количества гемопоэтических СКК в периферической крови под воздействием Г-КСФ называется мобилизацией.

При подготовке к ВДТ с аутологичной трансплантацией мобилизация может проводиться или только ротовыми Г-КСФ или путем назначения Г-КСФ после определенных режимов химиотерапии. Химиотерапия перед мобилизацией сама по себе обладает высоким противоопухолевым воздействием, кроме того, значительно повышает вероятность сбора достаточного количества CD34+ СКК для аутооттрансплантации [2].

Собранные в специальные пластиковые контейнеры-пакеты CD34+ СКК подвергаются криоконсервации в жидком азоте, где могут храниться длительное время при -196 °С. После проведенной ВДТ, контейнер с CD34+ СКК размораживается при 37—40 °С и производится введение лейкоконцентрата в центральную вену. Через определенный промежуток вре-

мени происходит выход из аплазии кроветворения и восстановление нормальных показателей крови. Таким образом, аутотрансплантация является методом сопровождения высокоэффективной химиотерапии, когда речь идет о принципиальной химиочувствительности опухолевых клеток к очень высоким дозам цитостатических агентов. В случае аутоиммунных заболеваний, в частности при рассеянном склерозе, высокодозное цитостатическое воздействие приводит к максимальной деплеции клона аутоагрессивных Т- и В-лимфоцитов, что определяет высокую клиническую эффективность [3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Освоение современных циторедуктивных режимов химиотерапии и программ мобилизации и сбора CD34+ стволовых кроветворных клеток при множественной миеломе.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2000 года в отделении гематологии Волгоградского областного клинического онкологического диспансера № 1 проводилось последовательное освоение режимов полихимиотерапии второй линии, необходимых как для лечения пациентов с лимфатическими опухолями, не достигавших полной ремиссии на терапии первой линии, так и использующихся в мировой гематологической практике на этапе сбора CD34+ СКК. Большинство программ этого направления содержат препараты, как правило, не используемые в терапии первой линии, — производные платины и нитрозомочевины, мелфалан, высокие дозы цитозара и метотрексата и др. До появления возможности сбора периферических СКК освоенные программы полихимиотерапии значительно улучшили исходы неходжкинских лимфом и лимфогранулематоза среди пациентов клиники.

После приобретения диспансером клеточного сепаратора производства Fresenius в 2005 году появилась возможность мобилизации и сбора CD34+ СКК.

Первая мобилизация СКК была выполнена в ГУЗ ВОКОД № 1 в августе 2005 года у пациента гематологического отделения 33 лет, с неблагоприятным течением лимфогранулематоза. Сбор клеток был осуществлен на фоне введения пациенту Г-КСФ (филграстим) после проведения режима полихимиотерапии EDHAP (этопозид, высокие дозы дексаметазона, высокие дозы цитозара, цисплатин). Этапы подсчета количества CD34+ клеток, определение их жизненной активности методом проточной цитофлуориметрии и криоконсервация материала были выполнены в Московском гематологическом научном центре РАМН.

В дальнейшем мобилизация и сбор проводились пациентам с множественной миеломой. Это свя-

зано с тем, что при множественной миеломе высокодозная терапия с аутологичной трансплантацией СКК является методом выбора для большинства пациентов моложе 60 лет [5]. Кроме того, для миеломы характерны высокие показатели сбора СКК при лейкоферезе после мобилизации [8].

При отсутствии показаний к ВДТ при множественной миеломе в первой линии используются препараты алкилирующего действия [алкеран, мелфалан] в сочетании с кортикостероидами и/или современными иммуномодулирующими, антиангиогенными и ингибирующими протеосомы препаратами [бортезомиб, талидомид, леналидомид]. При показаниях к ВДТ применение алкилаторов в первой линии противопоказано, дизайн лечения пациентов в общем виде представлен в следующей схеме.

Если ВДТ показана:

1 этап. Достижение полной или очень хорошей частичной ремиссии — 3—4 курса химиотерапии, включающей высокие дозы дексаметазона:

- в сочетании с антрациклинами (доксорубицин и др.);
- в сочетании с ингибиторами протеосом (бортезомиб);
- в сочетании с иммуномодулирующими и антиангиогенными агентами (леналидомид, талидомид).

2 этап. Мобилизация CD34+ СКК.

- Высокие дозы циклофосфана — 2—4 г/м² поверхности тела + Г-КСФ.

3 этап. Сбор CD34+ СКК из периферической крови посредством клеточного сепаратора (рис. 1).



Рис. 1. Клеточный сепаратор

4 этап. Подсчет СКК в собранном лейкоконцентрате (рис. 2).

5 этап. Кривоконсервация СКК в парах жидкого азота (рис. 3).

6 этап. Проведение пациенту терапии высокими дозами мелфалана — 150—200 мг/м² поверхности тела.

7 этап. Аутотрансплантация размороженных аутологичных CD34+ СКК на следующий день после окончания ВДТ.



Рис. 2. Проточный цитофлюориметр



Рис. 3. Кривоконсервация и хранение CD34 СКК в жидком азоте

Ниже перечислены случаи множественной миеломы с кратким описанием терапии первой линии и результатами сбора CD34+ СКК.

1. Пациент М., 50 лет. Диагноз: множественная миеломы, диффузно-очаговая форма, секреция моноклонального Ig G лямбда, стадия III A.

Диагноз установлен в марте 2009 года. По возрасту на момент заболевания пациент являлся кандидатом на высокодозную терапию под прикрытием аутотрансплантации СКК.

В этом случае до этапа мобилизации должна была быть проведена терапия, направленная на максимальное уменьшение опухолевой массы, с минимальной токсичностью для СКК костного мозга, например, режим PAD — бортезомиб («Велкейд»), доксорубин и высокие дозы дексаметазона [7].

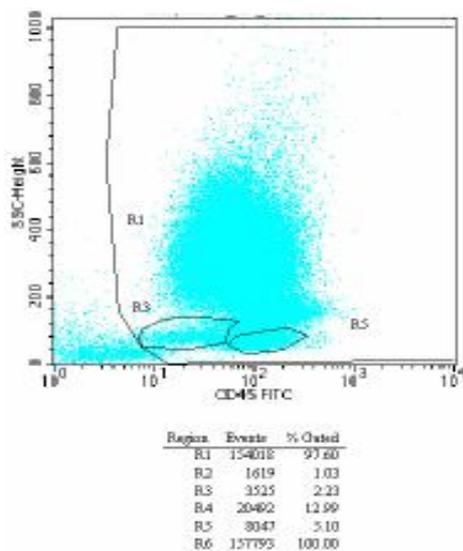
В отделении гематологии ГУЗ ВОКОД № 1 проведено 4 курса терапии по программе PAD.

Достигнута полная ремиссия заболевания по данным иммунохимического исследования сыворотки крови и мочи, рентгенографическим и морфологическим исследованиям.

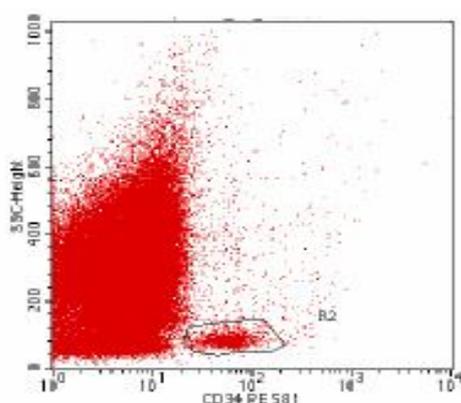
В качестве мобилизующей СКК терапии проведен курс высокими дозами циклофосфана — 4 г/м² поверхности тела с последующей стимуляцией кроветворения Г-КСФ (филграстим).

Всего выполнено 4 лейкофереза. За первый аферез собрано 2,5 x 10⁶ на кг массы больного CD34+ СКК, за второй аферез — 0,4 x 10⁶ на кг массы CD34+ СКК, за третий — 0,15 x 10⁶ на кг массы СКК и за четвертый лейкоферез — 3,2 x 10⁶ на кг массы CD34+ СКК. Таким образом, за четыре процедуры сепарации суммарно получено 6,25 x 10⁶ на кг массы больного CD34+ стволовых кроветворных клеток.

Рис. 4 демонстрирует этап проточной цитофлюориметрии собранного лейкоконцентрата. Цитометрия необходима для определения количества собранных CD34+ СКК.



A



Region	Event	% Gated	% Total
R1	154013	100.00	97.80
R2	1784	1.05	1.00
R3	3525	2.29	2.28
R4	20267	13.16	12.94
R5	8047	5.22	5.10
R6	154014	100.00	97.80

Б

Рис. 4. Подсчет количества стволовых клеток в образце лейкоконцентрата. По оси X: А — уровень экспрессии CD45 [общий лейкоцитарный антиген], Б — уровень экспрессии антигена CD34. Метод — проточная цитофлуорометрия

Необходимым количеством ауто-СКК для восстановления кроветворения после высокодозной терапии является $3,6 \times 10^6$ на килограмм массы больного CD34+ СКК [6]. То есть мы получили количество, позволяющее выполнить высокодозный этап лечения миеломы.

2. Пациентка Г., 55 лет. Диагноз: множественная миелома, диффузно-очаговая форма, секреция моноклонального IgG каппа, стадия III A.

Диагноз установлен в феврале 2009 года.

Полная ремиссия заболевания достигнута после 4 курсов PAD и одного курса бортезомиб+дексаметазон (VDex). В качестве мобилизующей СКК терапии проведен курс высокими дозами циклофосфана — 4 г/м^2 поверхности тела с последующей стимуляцией кроветворения Г-КСФ (филграстим). При первом лейкоферезе в контейнер собрано $2,14 \times 10^6$ на килограмм массы тела CD34+ СКК, при втором — $0,77 \times 10^6$, при третьем — $2,7 \times 10^6$ стволовых клеток на килограмм массы тела больной. Суммарное количество собранных и криоконсервированных CD34+ СКК — $5,61 \times 10^6$ на кг массы, что достаточно для восстановления кроветворения после ВДТ.

3. Пациентка Б., 58 лет. Диагноз: множественная миелома, диффузная форма, секреция моноклонального Ig G каппа, стадия III A.

Диагноз установлен в марте 2008 года.

После четырех курсов PAD (бортезомиб, доксорубин, высокие дозы дексаметазона) и трех VDex (велкейд, дексаметазон) достигнута частичная ремиссия заболевания — снижение секреции патологического иммуноглобулина на 90 %. Учитывая высокий риск прогрессирования миеломы и необходимость в этом случае назначения алкилирующих химиопрепа-

ратов, делающих последующую мобилизацию и сбор СКК проблематичной, решено провести мобилизацию на фоне частичной ремиссии. Подход к мобилизации в данном случае отличался от двух случаев, представленных выше. В качестве подготовки выполнялись только ежедневные введения Г-КСФ (филграстим). На пике лейкоцитоза в периферической крови осуществлено два последовательных афереза. За первый сеанс собрано 2×10^6 стволовых CD34+ кроветворных клеток на килограмм массы тела пациента, за второй — $1,9 \times 10^6$ СКК. Суммарно — $3,9 \times 10^6$.

Дальнейшая тактика.

Высокодозный этап лечения миеломы состоит в введении пациенту мелфалана в дозе 100 мг на квадратный метр поверхности тела в течение двух дней — суммарно 200 мг/ м^2 . На следующий день после последнего введения мелфалана выполняется размораживание заготовленных CD34+ СКК и введение их в центральную вену [4]. До восстановления показателей крови пациент будет находиться в гематологическом отделении гематологии и получать антибиотическую и гемокомпонентную терапию. Наиболее важной составляющей сопроводительной терапии является адекватное обеспечение большого аппаратным тромбоцитарным концентратом, приготовленным посредством клеточного сепаратора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие представленного направления зависит как от совершенствования службы заготовки компонентов крови (аппаратного тромбоконцентрата от одного донора), так и от возможности криоконсервирования СКК в нашей области.

В нашей работе этапы подсчета и определения жизненной активности СКК, а также криоконсервация выполнялись в Московском гематологическом научном центре РАМН.

Освоение мобилизационных режимов и методики сбора CD34+ стволовых кроветворных клеток — одно из новых направлений в онкогематологии, направленное на расширение доступности высокодозной терапии для пациентов Волгоградской области.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубаровская Л. С., Фрегатова Л. М., Афанасьев Б. В. Трансплантация гемопоэтических клеток при гемобластозах. Клиническая онкогематология / Под редакцией проф. М. А. Волковой — М.: Медицина, 2007. — С. 912—958.
2. Масчан А. А., Румянцев А. Г. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. — М.: Мед. информ. агентство, 2003. — 909 с.
3. Новик А. А., Богданов А. Н. Принципы трансплантации костного мозга и стволовых клеток периферической крови. — Спб.: Военно-медицинская академия, 2001. — 167 с.

4. Barlogie B., Jagannath S., Dixon D. O., et al. // Blood. — 1990. — Vol.76. — P. 677—680.

5. Durie B. G., Kyle R., Belch A., et al. Initial recommendations International Myeloma Working Group. A publication of International Myeloma Foundation. — 2003. — 30 p.

6. Harousseau J. L., et al. // Curr. Opin. Oncol. — 2005. — Vol. 17. — P. 93—98.

7. Oakervee H. E., Popat R., Curry N., et al. // Br. Jour. of Haematol. — 2005. — Vol. 129. — P. 755—762.

8. Perea G., Sureda A., Martino R., et al. // Ann. of Hematol. — 2001. — Vol. 80. — P. 592—597.

Контактная информация:

Капланов Камиль Даниялович — к. м. н., зав. отделением гематологии ГУЗ Волгоградский областной клинический онкологический диспансер №1, e-mail: kamilos@mail.ru

УДК 615.1.616.379-008.64(470.47)

ЗНАЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА CYP2C9 ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА У КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ

В. И. Петров, Н. В. Рогова, Д. О. Михайлова, Я. М. Ледяев, Д. М. Сердюкова, О. М. Тягинова

Кафедра клинической фармакологии ВолГМУ

С целью поиска путей оптимизации фармакотерапии больных сахарным диабетом 2-го типа среди коренных жителей Республики Калмыкия впервые было проведено фармакокинетическое типирование активности изофермента CYP2C9 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выявлена высокая встречаемость фенотипов, характеризующих сниженную активность изофермента CYP2C9 в данной этнической группе, что позволяет рекомендовать использование определения активности данного изофермента для оптимизации фармакотерапии производными сульфонилмочевины и снижения риска развития нежелательных лекарственных реакций.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, высокоэффективная жидкостная хроматография, фармакокинетическое типирование, активность изофермента CYP2C9, оптимизации фармакотерапии.

VALUE OF PHARMACOKINETIC TYPING FOR CYP2C9 ACTIVITY TO ENHANCE PHARMACOTHERAPY OF TYPE II DIABETES IN INDIGENOUS PEOPLE OF THE REPUBLIC OF KALMYKIA

V. I. Petrov, N. V. Rogova, D. O. Mikhailova, Y. M. Ledyayev, D. M. Serdukova, O. M. Tyaginova

With a view to finding a way to enhance pharmacotherapy for type II diabetic patients in indigenous people of the Republic of Kalmykia there was first carried out a pharmacokinetic typing for CYP2C9 activity with the help of high performance liquid chromatography. The study revealed a high incidence of the phenotypes that characterize reduced CYP2C9 activity in this ethnic group, which allows us to recommend evaluation of the CYP2C9 activity so as to enhance pharmacotherapy by using sulfonylurea derivatives and reduce the risks of developing undesirable drug reactions.

Key words: diabetes type II, high performance liquid chromatography, pharmacokinetic typing, CYP2C9 activity, enhancement of pharmacotherapy.

У пациентов, страдающих сахарным диабетом, на фоне проводимой фармакотерапии, нежелательные лекарственные реакции развиваются в 4—29 % случаев [4]. Одно из ведущих мест среди них занимают гипогликемические состояния на фоне терапии сахарного диабета 2-го типа (СД2) пероральными сахароснижающими средствами — производными сульфонилмочевины [3]. Так как производные сульфонилмочевины метаболизируются с участием изофермента CYP2C9, его активность является одним из факторов, определяющих концентрацию в крови и выраженность фармакодинамических эффектов этих лекарственных средств [1, 2, 10, 11]. Изменение ак-

тивности изофермента CYP2C9 может быть связано с генетическим полиморфизмом [5, 11, 12]. Фенотипирование изофермента CYP2C9 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет с высокой степенью достоверности судить о вариациях его активности [9, 13, 14], что может использоваться для индивидуализации дозирования лекарственной терапии у больных, страдающих СД2.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Поиск путей оптимизации фармакотерапии больных СД2 с помощью учета при дозировании лекарствен-