УДК 616—006.441—085.361.018.46—089.843

НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ И БЛИЖАЙШИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

Е.П. Сведенцов, В.В. Черепанова, А.А. Костяев, Н.А. Федоровская, В.В. Журавлев, А.С. Косков, Н.В. Рябов. И.А. Докшина, Ю.И. Югов

Кировский НИИ гематологии и переливания крови (директор — с.н.с. С.Л. Шарыгин) МЗ РФ

Аутологичная трансплантация костного мозга (АуТКМ) находит все большее применение в лечении злокачественных лимфом, некоторых солидных опухолей и острых лейкозов [8, 9, 11]. Основными предпосылками успешного выполнения АуТКМ являются наличие у больного клинико-гематологической ремиссии заболевания, то есть минимальное содержание резидуальных опухолевых клеток в костном мозге, и получение достаточного количества жизнеспособных стволовых клеток в процессе взятия, сепарации и криоконсервирования костного мозга.

В центре трансплантации костного мозга КНИИГиПК в 1994—1995 гг. выполнено 8 аутологичных трансплантаций костного мозга. Взятие костного мозга производили под общей анестезией путем множественных пункций и аспираций из задней и передней трети гребней крыльев подвздошных костей в 10 мл пластиковые шприцы, каждый из которых содержал 1 мл раствора гепарина (12,5 ЕД гепарина на 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия). После прокола кости иглой с мандреном в шприц аспирировали 3 мл костного мозга (соотношение костного мозга и стабилизирующего раствора — 3:1). После каждой аспирации шприц промывали раствором гепарина.

В один из спаренных полимерных мешков "Компопласт" 300/300, освобожденых от гемоконсервантов, собирали 250—300 мл стабилизированного миелоэксфузата. Содержимое пластикатного мешка во время операции эксфузии костного мозга интенсивно перемешивали для предупреждения свертывания сгустков. Заготавливали 5-6 указанных мешков. В каждом из мешков подсчитывали содержание ядерных клеток в миеловзвеси для определения их абсолютного количества на 1 кг массы аутодонора [3].

На втором этапе к указанному объему миеловзвеси в каждый пластикатный мешок для осаждения эритроцитов добавляли 45 мл 10% раствора медицинского желатина, подогретого до 37°С на водяной бане. Взвесь костного мозга с раствором желатина тщательно перемешивали и мешки "Компопласт"-300 подвешивали на 30—45 минут до образования четкой границы между эритроцитами и надосадком — плазмой, обогащенной ядерными клетками костного мозга.

После разделения костномозговой взвеси на две фракции, во время третьего этапа, с помощью плазмоэкстрактора надосадок переводили в спаренный пустой мешок объемом 300 мл, удалив из него воздух. В основном пластикатном мешке оставляли эритроцитную массу с примесью неотделенных миелокариоцитов. Чтобы максимально выделить из эритроцитной массы ядросодержащие клетки костного мозга, процедуру их извлечения повторяли с помощью 10% раствора желатина.

На четвертом этапе эритроцитную массу разбавляли изотоническим 0,9% раствором хлорида натрия в соотношении 5:1 и возвращали аутодонору.

Для концентрации выделенных миелокариоцитов мешки "Компопласт"-300 с надосадком, обогащенным ядерными клетками костного мозга, центрифугировали в режиме 1750 g × 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования надосадок без ядерных клеток переводили в дополнительный пластикатный мешок "Компопласт"-300 для приготовления хладоограждающего раствора с криоконсервантом гекмолитом. Для отмывания миелокариоцитов от примесей в каждый пластикатный мешок, содержащий костномозговую взвесь, добавляли в соотношении 1:5 (50 мл : 250 мл) 10% раствор охлажденной аутологичной плазмы (надосадок после центрифугирования) в изотоническом 0,9% растворе хлорида натрия. Аккуратно перемешивали и центрифу-

гировали в режиме 1750 g x 7 мин при комнатной температуре. Удаляли с помощью плазмоэкстрактора надосадочную жидкость; объем клеточной взвеси в каждом пластикатном мешке составлял около 30 мл.

Содержимое мешков сводили в один "Компопласт"-300, определяли конечный объем миеловзвеси. Минимальное количество (3-4 мл) миеловзвеси использовали для подсчета количества жизнеспособных ядерных клеток в пробе с витальным красителем (трипановый синий), культуральных исследований, приготовления мазков. После этого миелокариоциты разводили аутологичной плазмой до конечной концентрации 40—50 · 10^9 /л и переносили в холодильник при 4°С или на заранее приготовленный лед [2].

Осадок ядерных клеток костного мозга в аутоплазме осторожно и тщательно ресуспендировали. Полученную взвесь гемопоэтических клеток смешивали в соотношении 1:1 с препаратом гекмолитом [4], тщательно перемешивали и переводили через разовую систему с капроновым фильтром (ПК 21-01) в металлические ребристые контейнеры емкостью 140—160 мл. В них после 20-минутного уравновешивания суспензии костномозговых клеток с криоконсервантом гекмолитом производили криоконсервирование, используя имитатор, в аппарате УОП 00 00 00 Института проблем криобиологии и криомедицины АН РУ по трехэтапной программе.

На первом этапе охлаждали миеловзвесь от +17°С до —7°С со скоростью 1°С в 1 мин, на втором этапе — от —7°С до —40°С со скоростью 10°С в 1 мин, на третьем — от —41° С до —140° С со скоростью 20° С в 1 мин с последующим погружением контейнеров в жидкий азот, где они хранились до ретрансплантации костного мозга.

Размораживание костного мозга осуществляли в 20-литровой водяной ванне при температуре +39°С в течение 20—25 с, покачивая контейнеры 4 раза в секунду. Миеловзвесь из контейнеров переводили в пластикатный мешок "Компопласт"-300, разводили аутологичной сывороткой крови в соотношении 1:1 и трансплантировали внутривенно тому больному, у которого был заготовлен данный костный мозг. Новый хладоограждающий препарат гекмолит имеет в своем составе вещество А-378, обладающее смешанным экстра- и интрацеллюлярным криопротекторным действием и в 3 раза менее токсичным, чем известные протекторы глицерин, диметилацетамид, и в 4 раза менее токсичным, чем диметилсульфоксид. Поэтому препарат гекмолит не требует отмывания оттаянной миеловзвеси перед ее клиническим применением. Он сохраняет, по нашим данным, в костном мозге доноров после размораживания 91,5 ± 1,8% миелокариоцитов с жизнеспособностью по витальному красителю 80,3 ± 4,4% и биологической полноценностью 76% (КОЕ-ГМ) стволовых клеток, по данным других авторов [1] — 65,5% (КОЕ-ГМ). В размороженном костном мозге онкогематологических больных, получавших несколько курсов полихимиотерапии, указанные показатели миелокариоцитов снижены на 10—14%. Надежное приживление аутологичного костного мозга происходит при сохранении 50% КОЕ-ГМ [1, 7].

Среди больных, которые перенесли АуТКМ, у 2 были солидные опухоли, у одной — лимфогранулематоз (ЛГМ), у 4 — острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и у одного — миеломная болезнь (см. табл.).

Взятие костного мозга у больных в объеме 1100—1300 мл (без консерванта) не вызывало анемизации, выраженных проявлений постмиелоэксфузионного синдрома и других осложнений. Их предупреждали переливанием во время операции аутологичной крови, заготовленной за 4—5 дней до миелоэксфузии, а непосредственно после нее — аутологичных эритроцитов и плазмы, отделенных от миеловзвеси.

Все больные для предотвращения экзогенного инфицирования находились в блоке одноместных стерильных палат, имеющих автономную вентиляцию и отдельное помещение для раздачи пищи и обработки посуды. В блоке поддерживался специальный санитарно-эпидемиологический режим: 2 раза в день проводилась асептическая влажная уборка, ультрафиолетовое облучение по 20 минут через каждые 2 часа. Медицинские работники пользовались стерильными костюмами, шапочками, масками, бахилами, дезинфицировали руки при входе в блок, стерильную палату, до и после каждой

Клинико-гематологические показатели больных, перенесших аутологичную трансплантацию костного мозга

Показатели	Данные о пациентах: возраст, рост, масса тела							
	б-ой П., 41 г., 1,97 м, 82 кг	б-ая Ч., 25 лет, 1,5 м, 51,5 кг	б-ой Б., 32 г, 1,94 м, 77 кг	б-ой Н., 43 г., 1,75 м, 71 кг	б-ой Я., 38 лет, 1,7 м, 60,2 кг	б-ой Ш., 23 г., 1,72 м, 61,5 кг	б-ой М., 26 лет, 1,78 м, 63 кг	б-ая К., 32 г., 1,86 м, 76 кг
Диагноз	переходно-клеточный рак мочевого пузыря T_3-T_4 N_x M_o	ЛГМ IIB стадия с поражением л/у средостения	ОМЛ, M_4	ОМЛ, M_1	миеломная болезнь, диффузно-очаговая форма	эмбрио-нальный рак правого яичка	ОМЛ, M_3	ОМЛ, M_1
Дата АуТКМ	11.07.94	09.11.94	27.12.94	09.12.94	19.06.95	28.06.95	20.11.95	29.12.95
Режим кондиционирования	цисплатин адриамицин 5-фторурацил циклофосфан	CVB	CVB	CVB	мелфалан	цисплатин рубомицин вепезид	CVB	TACC
Эксфузия, км	06.07.94	28.09.94	06.12.94	01.11.94	17.05.95	08.06.95	13.10.95	29.12.95
Клеточность трансплантата после эксфузии, $\times 10^9$	18,4	12	12,3	13	8,7	18,7	13,5	17,4
Клеточность трансплантата после размораживания, $\times 10^9$	11,9	11,1	9,0	13,8	5,0	10,7	13,7	15,1
Число инфузированных ядросодержащих клеток, $\times 10^8$/кг	1,4	2,1	1,2	1,9	0,8	1,7	2,8	2,0
Жизнеспособность (по трипановому синему), %	79,5	54	70	64	76	70	72,5	82
Число Le > 1,0 × 10^9 (дни после АуТКМ)	+14	+18	+34	+12	+35	+8	+31	+13
Число нейтрофилов > 0,5 $\times 10^9$/л (дни после АуТКМ)	+14	+20	+40	+15	+35	+16	+31	+13
Число тромбоцитов > 20 x 10^9/л (дни после АуТКМ)	+3	+14	+28	+12	+40	не отмечалось	+25	не отмечалось
Уровень Hb > 100 г/л (дни после АуТКМ)	не снижался	+46	+60	+40	не поднимался	не снижался	+53	+50
Трансфузии тромбоконцентрата, ЕД	12	34	53	36	24	не проводилось	40	15
Трансфузии эритроцитов,число стандартных доз	5	13	4	2	141	1	7	3
Лейкомакс, 5 мкг/кг/день	№ 11	№ 17	№ 32	№ 17	№ 30	№ 12	№ 28	№ 18
Длительность наблюдения после АуТКМ, мес	27	21	20	21	70 дней	15	10	9
Текущее состояние	удовл.	удовл.	удовл.	удовл.	умер от рецидива	удовл.	удовл.	удовл.
День выписки после АуТКМ	+22	+37	+41	+45	+41	+21	+53	+25

манипуляции. Пациентам ежедневно меняли стерильное нательное и постельное белье, двухкратно в течение суток обрабатывали кожу 3% раствором борного спирта, а слизистую рта — антисептиками. В период агранулоцитоза больные принимали стерилизованную пищу.

Для деконтаминации пищеварительного тракта больным назначали внутрь ристомицин (1 г/сут), полимиксин (1 г/сут), канамицин (1 г/сут), нистатин (8 млн/сут). Перед кондиционированием пациентам санировали полость рта.

Микробиологические исследования проводили 2 раза в неделю (зев, нос, подмышечные и паховые области), кровь на посев — один раз в неделю. Постоянно контролировали стерильность воздуха, предметов из стерильной зоны.

При подготовке к АуТКМ использовали следующие режимы кондиционирования: 1) при ЛГМ и ОМЛ — CVB (Cph 1,0 г/м^2) ежедневно 3 дня, VP-16 (200 мг/м^2) 3 дня, BCNU (от 2000 до 300 мг/м^2) один день; 2) при миеломной болезни — мелфалан (180 мг/м^2) в течение 2 дней; 3) при переходно-клеточном раке мочевого пузыря — цисплатин (122 мг/м^2), адриамицин (142 мг/м^2), 5-фторурацил (2440 мг/м^2), циклофосфан (5700 мг/м^2); 4) при эмбриональном раке мужских половых желез — цисплатин (100 мг/м^2), рубомицин (60 мг/м^2), вепезид (600 мг/м^2) [5, 6, 7]. При кондиционировании проводили противорвотную терапию новобаном по обычной схеме. Она оказалась достаточно эффективной: выраженная рвота и тошнота наблюдались лишь у одного больного. Осложнений во время кондиционирования не возникло. Всем больным размороженный костный мозг трансплантировали внутривенно.

Средняя клеточность трансплантата составила 2,1 · 10^8 на 1 кг массы тела реципиента (колебания — от 3,1 до 1,4 · 10^8). После размораживания образцов аутологичного костного мозга содержание жизнеспособных ядросодержащих клеток равнялось в среднем 1,7 · 10^8 на 1 кг массы тела (колебания — от 2,17 до 0,83 · 10^8 на 1 кг массы).

Во время внутривенной трансплантации аутологичной костномозговой взвеси у большинства больных наблюдалась выраженная гипертензия (АД больше 200/120 мм Hg), сопровождаемая интенсивной головной болью, у одного больного — тризм жевательной мускулатуры, а непосредственно после инфузии миелокариоцитов — гемоглобинурия у всех больных.

Длительность агранулоцитоза колебалась от 14 до 15 дней. Она определяла частоту и выраженность инфекционно-септических осложнений (см. табл.).

Терапию инфекционных осложнений проводили по ступенчатому плану эмпирической антибактериальной терапии [10]. Показаниями к назначению антибактериальной терапии при агранулоцитозе являлись: а) устойчивая температура до 38—38,5°С без ее снижения в течение 12 часов (на фоне стабильной гемодинамики) и без видимого очага инфекции; б) нарастающее повышение температуры в течение 2 часов на фоне стабильной гемодинамики; в) повышение температуры более 38,5°С на фоне гипотензии (АД менее 90 мм Hg), что является признаком инфекционно-септического шока и требует немедленного назначения антибиотиков; г) наличие пневмонии.

На первом этапе использовали антибиотики, эффективные в отношении грамотрицательных аэробных микроорганизмов, на втором — дополнительно назначали антибиотики, наиболее эффективные в отношении грамположительных аэробных бактерий, а на третьем — противогрибковый препарат амфотерицин В или дифлюкан. Герпетическую инфекцию предупреждали ацикловиром.

5 больным после АуТКМ в состоянии агранулоцитоза в целях профилактики применяли внутривенно нормальный человеческий иммуноглобулин в средней дозе 15 мл/кг (0,8 г белка/кг). У 3 из них возник катаральный стоматит и у одного — язвенный. Ни у одного больного после профилактического введения иммуноглобулина не развилось осложнений, угрожавших жизни. Наоборот, у больной, не получившей его в целях профилактики, развился тяжелый сепсис, вызванный ассоциацией возбудителей (синегнойная палочка, грамположительная флора).

Для стимуляции гемопоэтической реконструкции после АуТКМ у всех пациентов применяли лейко-

макс (Sandos/Schering-Plough) в дозе 5 мкг/(кг/сут) путем длительной внутривенной инфузии до достижения числа нейтрофилов выше $0,5 \cdot 10^9$/л.

Все компоненты крови, переливаемые больным, подвергали радиационному облучению на гамматерапевтической установке "АГАТ РМ 105" в дозе 15 Гр (концентрат тромбоцитов), 25 Гр (отмытые эритроциты), 18 Гр (свежезамороженная плазма).

Профилактику токсических осложнений и геморрагического цистита проводили методом форсированного диуреза (инфузия стандартного раствора в объеме 3 л на 1 м^2 поверхности тела в сутки) с применением 4% раствора соды и поддержанием массивного диуреза со слабощелочной реакцией мочи (pH 7,0—7,2).

Необходимость в заместительной терапии компонентами крови возникала на сроках от 4 до 69-го дня. Концентраты тромбоцитов переливали при уровне кровяных пластинок ниже $20 \cdot 10^9$/л или при появлении геморрагического синдрома. Эритроцитную массу трансфузировали при уровне гемоглобина ниже 80 г/л. Динамика восстановления гемопоэза и количество трансфузий облученных компонентов у 8 пациентов показаны в таблице. 4 пациентам с выраженным мукозитом в раннем посттрансплантационном периоде потребовалось парентеральное питание.

У всех 8 больных, которым после кондиционирования производилась АуТКМ, были выписаны из клиники с восстановленным кроветворением.

Для профилактики геморрагических осложнений в среднем потребовалось 27 ед. тромбоконцентрата (от 12 до 53 ед.).

В настоящее время после АуТКМ наблюдаются 7 больных. Длительность наблюдения — от 27 до 9 месяцев. Больной с миеломной болезнью погиб через 2 месяца после АуТКМ от рецидива заболевания. Несмотря на относительно небольшое количество наблюдений, необходимо отметить, что после проведения АуТКМ у больных с солидными опухолями наблюдается меньшая токсичность, меньшее число инфекционных осложнений, более быстрое восстановление кроветворения, чем у больных ОМЛ. Больным с острым лейкозом и онкопатологией после трансплантации не требовалось поддерживающей терапии, качество жизни оставалось высоким. Это оправдывает применение АуТКМ в комплексе программной полихимиотерапии у онкологических и онкогематологических больных. Клинические исследования показали перспективность использования отечественного криопроконсерванта гекмолита для заготовки аутологичного костного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М., Моисеев С.И., Ганапиев А.А. и др.// Гемат. и трансфузиол. — 1995. — № 2. — С. 40—42.

2. Костяев Л.А. Новый метод заготовки аутологичного костного мозга, его криоконсервирование и применение для клинических целей: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — М., 1984.

3. Сведенцов Е.П., Костяев А.А., Рахматулаев А. Получение костного мозга для клинических целей. — Ташкент, 1993.

4. Сведенцов Е.П., Архиреев В.П., Симкин Д.С., Кузнецов Е.В. Средство для консервирования костного мозга. — Патент 2049391 РФ. — 1995.

5. Ager S., Mahendra P., Bass G. et al.// Bone marrow trans. — 1994. — Abstrakt Book. — N.-Y.— P. 101.

6. Barlogie B., Alexanian R., Dicke K.A. et al.// Blood. — 1987. — Vol.70. — P. 869—872.

7. Gorin N.C., Douay L., David R. et al.// Europ. J. Cancer clin. Oncol. — 1983. — Vol. 19. — P. 485—491.

8. Jagannat S., Barlogie B., Dicke K. et al.// Blood. — 1990. — Vol. 76. — P. 1860—1866.

9. Jehn U., Berghof H., Heinmann V. Supportive Thtrapie bei Leukemie. — Patienten. — Georg. Thieme Verlag Stuttgart—N.-Y., 1992.

10. Philips G.L., Wolf S.N., Herzig R.H. et al.// Blood. — 1989. — Vol. 73. — P. 2086—2092.

11. Stewart F.M.// Bone Marrow Transplantation: Fountation for the 21-st Cenery.— N.-Y., 1995.

Поступила 26.10.96.

AUTOLOGIC TRANSPLANTATION OF THE BONE MARROW: IMMEDIATE AND NEXT RESULTS

E.P. Svedentsov, V.V. Cherepanova, A.A. Kostyaev, N.A. Fedorovskaya, V.V. Zhuravlev, A.S. Koskov, N.V. Ryabov, I.A. Dokshina, Yu.I. Yugov

Summary

As many as 8 autologic transplantations of the bone marow are performed: 5 patients with hemoblastoses, 1 patient with lymphogranulomatosis and 2 patients with great tumors. The bone marrow is preserved in liquid nitrogen using the programmed freezer with home cryoconservator "Gekmolit". All patients are discharged. One patient with myelogenetic disease died in 70 days after transplantation and disease relapse. The state of the other 7 patients is satisfactory in 9—27 months.