

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

«12» июня 2013г.

Регистрационный № 061-0513

**МЕТОД АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СО СНИЖЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ РЕЖИ-  
МА КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С РЕЦИ-  
ДИВАМИ ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗА ПОСЛЕ АУТОЛОГИЧНОЙ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК  
инструкция по применению**

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:** Учреждение здравоохранения «9-я город-  
ская клиническая больница» г. Минска

**АВТОРЫ:** доктор медицинских наук, профессор Усс А.Л., кандидат меди-  
цинских наук Миланович Н.Ф., кандидат медицинских наук, доцент Левин  
В.И., Морозова О.М., Стронгин Ю.С., Старцева А.Ю.

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее – Инструкция) содержит описание применения метода аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациентам с неблагоприятным течением лимфогранулематоза (ЛГМ), а именно при развитии рецидива или прогрессии заболевания после использования всего стандартного арсенала противоопухолевой терапии, включая высокодозную полихимиотерапию (ВД ПХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических клеток (аутоТГК).

Инструкция рассчитана на врачей-онкологов, врачей-гематологов, врачей-трансплантологов, врачей лабораторной диагностики. Область применения: онкология, гематология, трансплантология, клеточные биотехнологии. Уровень внедрения: специализированные отделения.

## **Перечень необходимого оборудования и расходных материалов**

### *Медицинское оборудование*

1. Мультипараметрический флуоресцентный анализатор.
2. Бокс биологической защиты II кл. с вертикальным потоком воздуха.
3. Термоциклер (амплификатор).
4. Автоматическая станция выделения ДНК.
5. Спектрофотометр для измерения концентрации ДНК.
6. Термостатический блок для пробирок типа «Эппендорф».
7. Центрифуга/вортекс для пробирок типа «Эппендорф».
8. SSO-гибридизатор.
9. SSO-стрип-сканер.
10. Микроцентрифуга для пробирок типа “Эппендорф” до 16 тыс. г.
11. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания.
12. Весы (Дискретность 0,0001 г).
13. Система гель-документирования.

14. Микроволновая печь (для плавления агарозы).
15. Холодильник.
16. Комплект автоматических дозаторов переменного объема (1-канальных, 6-канальных).
17. Плазмоекстрактор.
18. Сепаратор клеток крови.
19. Микроскоп универсальный.
20. Ламинарный бокс 2-й степени защиты с вертикальным потоком воздуха.
21. Центрифуга.
22. Проточный цитофлуориметр.
23. Анализатор микробиологический.

#### *Расходные материалы*

1. Набор аспирационных игл и шприцев.
2. Стерильный операционный материал (простыни, пленки).
3. Раствор антикоагулянта, в состав которого входит гепарин и электролитная среда в соотношении 100 ЕД/мл.
4. Гидроксиэтилкрахмал.
5. Раствор Хэнкса.
6. Цитратный раствор в декстрозе, формула - А (ACD-A)
7. Трипановый синий.
8. Камера Горяева.
9. Моноклональные антитела для проточной цитометрии: CD34 +.
10. Специализированные среды для посева на бактериальную флору.
11. Комплект для забора и фильтрации костного мозга – для асептического сбора костномозговой взвеси и её очистки от мелких костных обломков,

сгустков крови с 3 – х ступенчатой системой фильтрации через систему фильтров с диаметром пор 500, 500 и 200 микрон.

12. Сеты для афереза стволовых клеток к сепаратору клеток крови.
13. Комплект реагентов для проведения HLA типирования методом SSO.
14. Комплект реагентов для проведения HLA типирования методом SSP.
15. Комплект реагентов для выделения ДНК из цельной крови.
16. Наконечники для механических дозаторов (переменного объема), с фильтром, для ПЦР.
17. Наборы для проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле.
18. Микропробирки типа «Эппендорф» (переменного объема).
19. Пробирки для забора венозной крови с ЭДТА.
20. Стеклянная лабораторная посуда.
21. Цитостатические лекарственные средства: мелфалан, флударабин.
22. Иммуносупрессивные лекарственные средства: антитимоцитарный иммуноглобулин, такролимус, микофеноловая кислота.
23. Лекарственные средства рекомбинантных ростовых факторов (Г-КСФ).
24. Лекарственные средства для сопроводительной терапии (представлены в таблицах 2-4).

### **Показания к применению**

1. Верифицированный рецидив ЛГМ после аутоТГК.
2. Возраст 18-65 лет.
3. Наличие донора, полностью совместимого с реципиентом по антигенам главного комплекса гистсовместимости.
4. Нормальные возрастно-половые показатели и данные клинико-лабораторного обследования.
5. Достаточная мотивация донора.

6. Наличие согласия на операцию, выраженного в письменной форме и заверенного нотариально.

### **Противопоказания к применению**

1. Беременность, кормление грудью.
2. Тяжелые сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания: застойная сердечная недостаточность, нестабильная стенокардия, нарушения ритма и проводимости, инфаркт миокарда.
3. Уровень сывороточного креатинина более 0,2 ммоль/л.
4. Тяжелая пневмония, дыхательная недостаточность: частота дыхания более 26-28 в минуту, артериальная гипоксемия менее 80 мм ртутного столба
5. Сепсис: септикопиемия, нестабильность гемодинамики (синдром системного воспалительного ответа), синдром полиорганной недостаточности.
6. Угрожающие жизни кровотечения, в том числе маточные, желудочно-кишечные, кровоизлияния в головной мозг.
7. Тяжелые психические нарушения с проявлениями продуктивной симптоматики.
8. Декомпенсированный сахарный диабет: уровень гликемии более 15 ммоль/л.
9. Острый гепатит, печеночная недостаточность.
10. Сопутствующие онкологические заболевания.

# Описание метода аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток со сниженной интенсивностью режима кондиционирования

## РАЗДЕЛ 1 Подбор донора

Одним из основных факторов, обуславливающих успешность выполнения алло-ТГСК, является подбор донора, совместимого с реципиентом по HLA-системе. Антигены HLA-системы I класса кодируются 17 генами, которые подразделяются на локусы А, В и С. В состав антигенов HLA-системы II класса входит D-регион, специфичность которого определяют 15 генов, в свою очередь разделенные на субрегионы DR, DQ, DP, DN и DO. Наиболее важным из них при алло-ТГСК является субрегион DR.

Идентичность донора с реципиентом по антигенам или генам I и II классов HLA-системы свидетельствует о наличии полностью совместимого донора. Несовпадение по 1, 2 или 3 антигенам HLA-системы указывает на частичную совместимость.

Донором гемопоэтических стволовых клеток может быть совместимый с реципиентом по HLA-системе здоровый человек без ограничений по возрасту. Различия по эритроцитарным антигенам (группе крови) при выборе донора значения не имеют.

*Алгоритм подбора пар донор-реципиент:*

типирование реципиента и всех его сибсов по антигенам или генам I класса системы HLA;

выбор предполагаемых доноров, совместимых с реципиентом по антигенам локусов А и В системы HLA;

типирование реципиента и совместимых с ним сибсов по антигенам или генам гистосовместимости II класса – локусы DR, DQ и DP;

определение фенотипа эритроцитов донора и реципиента по различным антигенным системам;

*Серологический метод определения HLA- антигенов.* Для определения HLA фенотипа I класса используется микролимфоцитотоксический тест. Лимфоциты выделяются из свежеполученной гепаринизированной крови методом флотации. 4 мл крови смешиваются с 5 мл PBS, наслаиваются на 3 мл фиколл-урографинового градиента и центрифугируются в течение 15 минут со скоростью 2700 оборотов в минуту. Образовавшееся беловатое кольцо мононуклеаров собирается пастеровской пипеткой и дважды отмывается в растворе PBS. Концентрация лимфоцитов доводится до  $2,0 \times 10^6 - 3,0 \times 10^6$ /мл. Суспензию лимфоцитов объемом 1 мкл вносится в лунки микрокамер с сыворотками, инкубируется 50 минут при температуре 22°C, затем добавляется 5 мкл кроличьего комплемента с разведенным в нем флуоресцентным красителем (акридиновый оранжевый + этидиум бромид) и инкубируется в течение 1 часа. Затем в лунки микрокамеры вносится 5 мкл раствора туши для остановки реакции. Учет результатов проводится путем оценки процента погибших клеток, окрашивающихся в красный цвет. Интенсивность реакции учитывается по шкале: 100-75% мертвых клеток – реакция резко положительная (++++), 75-50% мертвых клеток – реакция положительная (+++), 50-25 % мертвых клеток – реакция слабоположительная (++) , менее 25 % мертвых клеток – реакция отрицательная.

*Генетическое типирование HLA системы методом SSO.* Определение HLA антигенов I и II класса проводится с использованием метода ДНК-идентификации с помощью олигонуклеотидных зондов (SSO технология).

Данный тест обеспечивает результаты HLA-типирования с разрешением от низкого к среднему. В основе SSO теста лежат три основных процесса: ПЦР-амплификация гибрида амплифицированных продуктов с олигонуклеотидными зондами, специфическими к определенной последовательности ДНК, иммобилизованными на нейлоновой мембране, и последующая детекция связанных зондами продуктов амплификации посредством окрашивания.

## **РАЗДЕЛ 2 Получение и обработка трансплантата аллогенных гемопоэтических клеток**

Забор трансплантата аллогенных гемопоэтических клеток проводят при соблюдении следующих условий:

предупреждение донора о возможном ухудшении его здоровья в связи с будущим оперативным вмешательством;

наличия его согласия на операцию, выраженного в письменной форме и заверенного нотариально, (для лиц, не достигших 18-летнего возраста – письменно заверенного согласия родителей или органа опеки);

всестороннее обследование донора и наличие заключения врачей-специалистов о возможности забора костного мозга (КМ).

### *Подготовка и обследование донора*

осмотр, измерение роста и массы тела;

общий анализ крови (с подсчетом тромбоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитарной формулы);

биохимическое исследование крови: билирубин, аспартат-аминотрансфераза (АсАТ), аланин-аминотрансфераза (АлАТ), мочевины, креатинин, глюкоза, общий белок, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), калий, натрий, хлор.



определение групп крови по системам АВ0 и резус;  
определение титров изогемагглютининов;  
исследования на наличие: антител к вирусам иммунодефицита человека (HIV); гепатита С (анти-HCV); цитомегаловируса (CMV); вируса Эпштейна-Барр (EBV); вируса простого герпеса (HSV); антигена вируса гепатита В (HBsAg);  
электрокардиограмма (ЭКГ)  
общий анализ мочи;  
туберкулезный анамнез;  
определение антител к ВИЧ;  
комплекс серологических реакций на сифилис;  
психологическая подготовка донора, беседа о возможных осложнениях, получение письменного согласия донора.

Забор костного мозга выполняют в палате отделения трансплантации костного мозга, работающей в режиме операционной. Обезболивание: общий эндотрахеальный наркоз. Для получения трансплантата достаточной клеточности через 6-8 проколов кожи осуществляют от 100 до 200 проколов кости в радиальных направлениях. Место пункции - подвздошная кость – на 1-2 см кзади от передней верхней ости ее гребешка. КМ аспирируется иглами большого диаметра путем множественных пункций гребня крыла подвздошной кости с обеих сторон в шприцы, содержащие антикоагулянт (гепарин и электролитная среда в соотношении 100 ЕД/мл.). Через 6-8 проколов кожи осуществляется от 100 до 200 проколов кости в радиальных направлениях. Объем аспирируемой костномозговой взвеси определяют в зависимости от содержания ядросодержащих клеток (ЯСК) в аспирате, веса пациента и необходимости дополнительных манипуляций с полученным

трансплантатом (удаления плазмы и/или эритроцитов). Подсчет количества ЯСК в коллекционном мешке проводят в процессе забора трансплантата. Объем аспирируемой костномозговой взвеси в среднем составляет 1000-1300 мл, что соответствует  $2-3 \times 10^8$  ЯСК на килограмм веса реципиента. Аспират КМ очищают от мелких костных обломков, сгустков крови и частично от жира путем последовательного прохождения 3-х ступенчатой системы фильтров с диаметром пор 500, 200 и 200 микрон.

Дополнительная обработка костномозгового аспирата проводится при несовместимости пары донор – реципиент по эритроцитарным антигенам в системе АВО. Удаление плазмы осуществляется после центрифугирования клеточной взвеси в течение 10 минут при 2000 G и температуре 22°C, 70-75% плазмы крови удаляют при помощи плазмоекстрактора. Потеря ЯСК при этом не должна превышать 5%. Седиментацию эритроцитов проводят с помощью гидроксиэтилкрахмала по следующей методике. С помощью сбалансированного раствора Хэнкса доводят гематокрит трансплантата КМ до 25%. Добавляют ГЭК в соотношении 1:7 к объему КМ, тщательно перемешивают, и подвешивают мешок в перевернутом положении. После седиментации эритроциты медленно сливают в спаренный мешок, оставляя лейкоциты, тромбоциты, стволовые клетки, взвешенные в супернатанте. При этом примесь эритроцитов должна составлять не более 1% от начального объема.

После забора КМ донор находится под наблюдением врача-анестезиолога-реаниматолога. На следующий день после забора КМ донору выполняют контроль общего анализа крови. Донору назначаются препараты железа из расчета 5 мг элементарного железа на 1 кг массы тела.

Получение и обработка трансплантата стволовых клеток периферической крови. Для мобилизации стволовых клеток периферической крови (СКПК) у

здоровых доноров применяют лекарственные препараты рекомбинантных ростовых факторов Г-КСФ, в дозе 10 мкг/кг/сут в течение 5-6 дней. Аферез СКПК проводят на 4-й, 5-й и 6-й дни, когда наблюдается значительное повышение количества лейкоцитов периферической крови (в 4-10 раз), сопровождающееся увеличением уровня клеток-предшественников различных линий гемопоэза (CD34+ клетки). Критерием адекватности дозы СКПК для трансплантации является количество МНК, превышающее  $4 - 8 \cdot 10^8$ /кг или CD34+ клеток - более  $5 \cdot 10^6$ /кг. Подсчет ЯСК проводят в камере Горяева общепринятым методом с уксусной кислотой. Количество CD34+ клеток определяют методом проточной цитометрии. Коллекцию СКПК выполняют на сепараторе клеток крови по стандартной методике лейкафереза (соотношение антикоагулянт: кровь равно 1:12). В качестве антикоагулянта используют цитратный раствор в декстрозе (ACD-A). Для обеспечения адекватного венозного доступа при проведении лейкафереза проводят катетеризация периферических, а при их отсутствии, центральных (подключичной, яремной или бедренной) вен.

После завершения процесса сепарации СКПК в лаборатории криоконсервирования проводится обработка материала, заключающаяся в удалении эритроцитов при несовместимых по системе АВО трансплантациях, а также в сокращении объема за счет удаления плазмы.

### **РАЗДЕЛ 3 Выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток**

При поступлении в клинику с целью обеспечения необходимого объемом инфузионной терапии пациентам имплантируется центральный катетер. Особенности данного типа катетера являются: подкожная тоннелизация, которая значительно увеличивает расстояние от сосуда до места выхода ка-

тетера из-под кожи, уменьшая тем самым риск инфекции; дакроновая манжетка, которая активирует фибробласты и, срастаясь с тканями, фиксирует катетер, предотвращая экстракатетериальную миграцию микроорганизмов; использование специального рентгенконтрастного гибкого атромбогенного силиконированного материала; баллотирование кончика катетера с каждым сердечным циклом, что уменьшает контакт с эндотелием и вероятность развития тромботических осложнений; наличие более одного просвета, что позволяет одновременно вводить химически несовместимые медикаменты. Эти особенности позволяют использовать катетер длительное время – от нескольких недель до нескольких месяцев, в том числе амбулаторно.

### ***Протокол предтрансплантационной подготовки (кондиционирования) со сниженной интенсивностью***

*Характеристика иммуносупрессивных средств, включенных в протокол*

Флударабин - противоопухолевое средство, антиметаболит. Содержит флударабина фосфат, фторированный нуклеотидный аналог противовирусного агента, видарабина, 9- $\beta$ -D-арабинофуранозиладенина, который относительно устойчив к дезаминированию аденозиндезаминазой.

Мелфалан - производное азотистого иприта, относится к бифункциональным алкилирующим соединениям циклонеспецифичного действия. Фармакологическое действие - противоопухолевое, алкилирующее, цитостатическое, иммунодепрессивное. Вызывает первичное повреждение макромолекул ДНК и нарушает ее полимеризацию и редупликацию, способствует образованию дефектных форм ДНК и РНК и останавливает синтез белка. Цитотоксичность обусловлена блокадой межцепочечных перекрестных обратимых сшивок в молекуле ДНК вследствие ковалентного связывания с гуанином в 7 позиции и взаимодействия с фосфатными, сульфгидрильными

и другими группами нуклеиновых кислот и белков. Тем самым нарушается клеточная репликация. Активен в отношении покоящихся и активно делящихся опухолевых клеток

Антитимоцитарный иммуноглобулин – кроличий иммуноглобулин против Т-лимфоцитов человека. Препарат выделен из сыворотки кроликов, иммунизированных Т-лимфоцитами человека клеточной линии Jurkat. Представляет собой раствор с высоким титром поликлональных анти-Т-лимфоцитарных антител. Обладает иммуносупрессивной активностью. Оказывает прямое действие на Т-клетки, приводя к уменьшению их количества.

Таблица 1 -Схема протокола со сниженной интенсивностью

Препарат	Суточная доза	Способ введения	День введения	Общая доза за курс
Флударабин	25 мг/м <sup>2</sup>	внутривенно	-7, -6,-5,-4,-3	125 мг/ м <sup>2</sup>
Мелфалан	100 мг/м <sup>2</sup>	внутривенно	-2	100 мг/м <sup>2</sup>
АТГ	2,5 мг/кг	внутривенно	-3,-2,-1	7,5 мг/кг

*Последовательность введения препаратов:*

Лекарственное средство - Флударабин

Дни введения: -7 , -6, -5, -4

Доза на 1 введение — 25 мг/м<sup>2</sup>; суточная доза — 25 мг/м<sup>2</sup>; кратность введения — 1 раз в сутки.

Методика приготовления раствора препарата — содержимое каждого флакона (50 мг) следует растворить в 2 мл воды для инъекций. Каждый миллилитр приготовленного раствора содержит 25 мг флударабина фосфата. Требуемую дозу (рассчитанную исходя из поверхности тела пациента) набирают в шприц. Затем эту дозу разводят в 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия

Способ введения — внутривенная инфузия со скоростью 200 мл/ч (в течение 30 минут).

## Лекарственное средство - Мелфалан

Дни введения: -2

Доза на 1 введение — 100 мг/м<sup>2</sup>; суточная доза — 100 мг/м<sup>2</sup>; кратность введения — 1 раз в сутки.

Методика приготовления раствора препарата — содержимое каждого флакона (50 мг) следует растворить в прилагаемом растворителе, требуемую дозу (рассчитанную исходя из поверхности тела пациента) набирают в шприц, затем эту дозу разводят в 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Способ введения — внутривенная инфузия со скоростью 100 мл/ч (в течение 30 минут).

## Лекарственное средство - Антитимоцитарный иммуноглобулин

Дни введения: -3, -2, -1

Доза на 1 введение — 2,5 мг/кг; суточная доза — 2,5 мг/кг; кратность введения — 1 раз в сутки.

Методика приготовления раствора препарата — содержимое каждого флакона (100 мг) следует растворить в прилагаемом растворителе с последующим разведением в изотоническом солевом или декстрозном растворе (как правило, 50 мл на один флакон препарата).

Способ введения — внутривенная инфузия в крупную вену с большим кровотоком. Инфузия, длительностью менее 4-х часов не допустима.

Пациент должен находиться под пристальным наблюдением медицинского персонала в течение первых 30 мин после введения препарата и первых 3 дней лечения (для исключения риска развития анафилактического шока и других аллергических реакций).

*Инфузионная гидратационная терапия* должна начинаться не позднее, чем за 6 часов до первого введения флюдарабина. Ее необходимость определяет-

ся массивным цитолизом клеток. Цель - гипергидратация и защелачивание организма, в котором происходит цитоллиз. Объем внутривенной инфузии должен составлять не менее 3 литров на квадратный метр поверхности тела в сутки. Используются растворы: 0,9% раствор натрия хлорида, 5% раствор глюкозы, раствор Рингера, растворы электролитов. Необходимый контроль: водный баланс – каждые 4 часа, взвешивание – каждые 12 часов, контроль электролитов сыворотки крови - не реже 1 раза в сутки.

***Протокол профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ)***

*Характеристика иммуносупрессивных средств, включенных в протокол*

Такролимус - иммунодепрессант группы макролидов. Фармакодинамика. На молекулярном уровне эффекты такролимуса опосредуются связыванием с цитозольным белком (FKBP12), который отвечает за внутриклеточную аккумуляцию препарата. Комплекс РКBP12-такролимус специфически и конкурентно связывается с кальциневрином и ингибирует его, что приводит к кальций-зависимому ингибированию Т-клеточных сигнальных путей трансдукции, предотвращая таким образом транскрипцию дискретной группы лимфокинных генов. Такролимус является высокоактивным иммуносупрессивным препаратом: подавляет формирование цитотоксических лимфоцитов, которые, в основном, отвечают за отторжение трансплантата, снижает активацию Т-клеток, зависимую от Т-хелперов пролиферацию В-клеток, а также формирование лимфокинов (таких как интерлейкины-2, -3 и  $\gamma$ -интерферон), экспрессию рецептора интерлейкина-2.

Мофетила микофенолат - иммунодепрессант, ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы. Представляет собой 2-морфолиноэтиловый эфир микофенольной кислоты. Микофенольная кислота - мощный селективный не-

конкурентный и обратимый ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, который подавляет синтез гуанозинового нуклеотида *de novo*.

*Последовательность введения препаратов:*

Лекарственное средство - Такролимус

Дни введения: со дня -2 длительно, при отсутствии признаков РТПХ - в течение 180 дней.

Доза на 1 введение — 0,015 мг/кг; суточная доза — 0,015 мг/кг; кратность введения — круглосуточная (24-часовая) инфузия.

Методика приготовления раствора препарата — необходимое количество концентрата для приготовления раствора для инфузии после растворения в растворителе разводят в изотоническом солевом или 5% декстрозном растворе до концентрации 0,004-0,100 мг/мл. Общий объем инфузии - от 20 мл до 500 мл в течение 24 часов.

После приживления трансплантата, при отсутствии симптомов острой РТПХ, а также проявлений мукозита, осуществляется переход на пероральный прием такролимуса в суточной дозе соответствующей последней внутривенной, разделенной на 2 приема.

При появлении признаков токсичности необходимо снижение дозы. В раннем послеоперационном периоде необходим контроль минимального уровня такролимуса в цельной крови с частотой не реже 2 раз в неделю во время раннего посттрансплантационного периода, затем, в ходе поддерживающей терапии – периодически. Концентрация препарата в крови должна составлять 5-15 нг/мл.

Лекарственное средство - микофенолата мофетил

Дни введения: со дня +2 до дня +60, перорально



Доза на 1 прием —15 мг/кг; суточная доза —30 мг/кг; кратность приема— 2 раза в сутки, через 12 часов.

### ***Сопроводительная терапия***

*Гемотрансфузионная терапия.* С целью снижения иммуногенности все компоненты крови, переливаемые реципиентам гемопоэтических стволовых клеток, целесообразно подвергать гамма-облучению в дозе 30 Гр, и трансфузировать с использованием антилейкоцитарных фильтров. Абсолютным показанием к трансфузии эритроцитарной массы является уровень гемоглобина ниже 60 г/л и число эритроцитов менее  $2 \times 10^{12}$  /л. Трансфузии тромбоцитов показаны при их уровне в периферической крови менее  $5 \times 10^9$ /л. Наличие клинических проявлений геморрагического синдрома и/или гипертермии и инфекций служит показанием для трансфузии тромбоконцентрата при уровне тромбоцитов в пределах  $5-20 \times 10^9$ /л. Используются тромбоциты, полученные от одного донора методом тромбоцитозфереза. Компоненты крови, полученной от доноров, состоящих в родстве с больным, при аллотГСК предпочтительно не использовать.

При различиях групп крови донора и реципиента по системе АВО выбор групповой принадлежности гемотрансфузионной среды - в соответствии с результатами определения эритроцитарных антигенов и изогемагглютининов донорского типа в периферической крови реципиента.

*Гастропротекция:* ранитидин, омепразол или другие внутрь в профилактических дозах с -7 дня до восстановления показателей гемопоэза.

*Профилактика вено-окклюзионной болезни:* гепарин - 100 ЕД/кг/сут, внутривенно капельно с -1 дня до снижения уровня тромбоцитов  $<50 \times 10^9$ /л.

*Профилактика цитолитической гиперурикемии:* аллопуринол - 10 мг/кг/сут в 2 приема в таблетках с первого дня кондиционирования до дня -2

*Профилактика рвоты:* ондансетрон (гранисетрон, трописетрон) 8 мг до 3 раз/сут.

*Профилактика витаминной недостаточности:* витамин В комплекс внутривенно 2 мл - 1 раз/неделю; кальция фолинат 50 мг внутривенно в течение 2-х недель, далее фолиевая кислота 10 мг внутрь длительностью до 1 года; витамин К – 20 мг 2 раза в неделю внутривенно, в течение 3-5 недель.

*Гидратация:* 0,9% раствор натрия хлорида, 5% раствор глюкозы, раствор Рингера – 3 литра/м<sup>2</sup>/сут внутривенно капельно. Скорость инфузии 200-300 мл/час.

*Поддержание уровня пассивного иммунитета:* иммуноглобулины для внутривенного введения: 100 мг/кг со дня -10 каждую неделю до дня 100, далее при снижении уровня IgG ниже 5 г/л 1 раз в 4 недели.

*Стимуляция гемопоэза:* пегфилграстим 6 мг подкожно 1 раз в 14 дней до 3-х введений или филграстим 300 мкг подкожно 1 раз в сутки; эритропоэтин 40 000 МЕ подкожно 1 раз в неделю, в течение 6-8 недель.

*Профилактика инфекционных осложнений.*

Профилактика бактериальных инфекций: ципрофлоксацин 250 мг каждые 12 часов или ломефлоксацин 400 мг 1 раз/сут перорально (позволяет снизить риск развития эндогенной кишечной инфекции); амоксициллин/клавулановая кислота 375 мг 3 раза/сут внутрь с -10 дня, отмена при назначении ванкомицина, возобновление при отмене системной антибактериальной терапии.

Профилактика протозойных инфекций: триметоприм-сульфаметоксазол 5 мг/кг/сут по триметоприму каждые 12 часов 3 раза в неделю со дня -10 до дня +120.

Профилактика вирусных инфекций: ацикловир внутривенно со дня -10 в дозе  $250 \text{ мг/м}^2$  3 раза/сут до перевода на пероральный прием. Доза для перорального приема –  $500 \text{ мг/м}^2$  3 раза /сут до дня +120, далее –  $250 \text{ мг/м}^2$  3 раза в сутки до дня +180; ганцикловир (только для ЦМВ-серопозитивных реципиентов)  $10 \text{ мг/кг/сут}$  за 2 введения внутривенно со дня -8 до дня -1. В посттрансплантационном периоде – после достижения приживления трансплантата.

Профилактика грибковых инфекций: изоляция пациентов в боксах с фильтруемым через HEPA фильтры воздухом, удаляющие споры грибов; флуконазол  $400 \text{ мг}$  1 раз в сутки перорально в течение 6 месяцев.

## **РАЗДЕЛ 5 Алгоритм мониторинга состояния пациентов при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток**

*Мониторинг состояния пациентов в течение проведения протокола кондиционирования и последующего нейтропенического периода*

Терапия кондиционирования, обладая высокой цитостатической и иммуносупрессивной активностью, вызывает токсические эффекты, что требует обязательного динамического наблюдения за состоянием органов и систем организма. С целью минимизации токсических осложнений предложен алгоритм мониторингового наблюдения за состоянием пациента в течение проведения протокола кондиционирования и последующего нейтропенического периода, включающий:

температура тела, пульс, артериальное давление, частота дыхания, центральное венозное давление – 4-6 раз/сут;

масса тела пациента – 1-2 раза в сутки;

подсчет объемов пищи и выпитой жидкости за сутки - ежедневно;

суточный диурез - ежедневно;

стул – объем и кратность в течение суток - ежедневно;

анализ крови общий – ежедневно;

анализ мочи общий – ежедневно;

биохимическое исследование крови: билирубин, мочевины, креатинин; АсАТ, АлАТ, глюкоза, натрий, калий, магний, кальций – ежедневно;

исследование показателей гемостаза – 2 раза в неделю; с агрегацией - по показаниям;

уровень калия, натрия, мочевины, при необходимости – глюкозы, в суточной моче - ежедневно;

гемоглобин плазмы, ЛДГ, щелочная фосфатаза (далее-ЩФ), ГГТП, С-реактивный белок, мочевины, метаболиты железа, амилаза, клиренс креатинина - 1 раз в неделю;

протеинограмма, иммуноглобулины крови – 1 раз в неделю;

ЭКГ; рентгенография органов грудной полости – 1 раз в неделю и по показаниям;

маркеры гепатитов В, С, дельта; ЦМВ, ЭБВ, вируса простого герпеса;

бактериологическое исследование - посевы из 7 эпитопов (зев; надключичная, подмышечная, паховая, перианальная области; область препуциального кольца или влагалища; ануса) – 1 раз в неделю;

уровень такролимуса в крови– 2 раза в неделю.

дополнительные методы обследования– по показаниям.

*Мониторинг состояния пациентов в течение раннего посттрансплантационного периода*

Кратность осмотров после аллотГСК (при отсутствии жизнеугрожающих осложнений): С момента выписки из стационара до дня + 100 дней - 1

раз в 2 недели; со дня +100 до дня +180 - 1 раз в месяц; со дня + 180 дней до 1 года -1 раз в 3 месяца. При развитии трансплантатозависимых осложнений, осмотры и выбор тестов для лабораторного мониторинга – по показаниям.

Рутинный лабораторный мониторинг должен включать:

- анализ крови общий с подсчетом лейкоцитарной формулы, тромбоцитов, ретикулоцитов, скорость оседания эритроцитов;
- биохимическое исследование крови: определение концентрации глюкозы, общего белка и белковых фракций, мочевины, креатинина, билирубина, кальция, натрия, кальция, магния; определение активности АлАТ, АсАТ, ЛДГ, ГГТП, гемоглобин плазмы, гаптоглобин;
- уровень такролимуса крови;
- исследование показателей гемостаза;
- общий анализ мочи;
- протеинограмма;
- иммуноглобулины крови;
- по показаниям – определение наличия вирусов простого герпеса, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр и другим методом ПЦР; рентгенография органов грудной полости; УЗИ органов брюшной полости ; исследование крови на эритроцитарный и/или лейкоцитарный химеризм; вирусологическое обследование: ЦМВ; ЭБВ - 1 раз в месяц и по показаниям;

#### *Мониторинг приживления трансплантата*

Одним из важных разделов проблемы ТГСК является лабораторный контроль функционирования трансплантата в организме реципиента. С целью контроля приживления трансплантата и выбора групповой принадлежности трансфузируемых компонентов крови (в случаях несовместимой по системе АВО ТГСК) проводится динамическое исследование эритроцитар-

ных антигенов, титров изогемагглютининов и цитогенетический анализ лейкоцитов периферической крови реципиентов ГСК по следующей схеме:

Контроль «эритроцитарной химеры» по предварительно выбранному антигенному маркеру или «цитогенетической химеры» (при разнополых ТГСК) – 1 раз в 2 недели, начиная со дня +14, в течение периода восстановления основных показателей гемопоэза, затем 1 раз в месяц в течение полугода, 1 раз в 3 месяца до года и 1 раз в 6 месяцев в течение долгосрочного наблюдения.

### **Осложнения, связанные с проведением аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток**

*Осложнения, связанные с токсичностью режима кондиционирования:*

- панцитопения (количество гранулоцитов в крови менее  $0,5-10^9/л$ , тромбоцитопения, анемия).
- поражение желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, мукозит, эзофагит, гастродуоденит, диарея);
- интерстициальный пневмонит — осложнение, наиболее часто встречающееся при использовании ТОТ в качестве режима кондиционирования;
- поражение сердечно-сосудистой системы: гипертензия, гипотония, нарушения ритма сердца, эндокардит;
- поражение почек и мочеполовой системы: острая почечная недостаточность, геморрагический цистит, гемолитико-уремический синдром;
- поражение кожи и алопеция;
- нейротоксичность;
- нарушение водно-электролитного баланса.

*Инфекционные осложнения:*

Развитие тяжелых иммунодефицитных состояний и гранулоцитопения после ТГСК приводят к появлению различных инфекций (бактериальные, вирусные, грибковые и т.д.), возникающих практически у всех пациентов на том или ином этапе в посттрансплантационном периоде (сепсис, пневмония, инфекции урогенитальной системы, желудочно-кишечного тракта, глаз и другие).

Лечение инфекционных осложнений в периоде нейтропении.

Развитие тяжелых иммунодефицитных состояний и гранулоцитопения после ТГСК приводят к появлению различных инфекций (бактериальные, вирусные, грибковые и другие), возникающих практически у всех пациентов на том или ином этапе в посттрансплантационном периоде (сепсис, пневмония, инфекции урогенитальной системы, желудочно-кишечного тракта, глаз и другие). Течение инфекции у пациентов с нейтропенией отличается тяжестью и быстрым прогрессированием при скудности ее клинических проявлений. Повышение температуры тела зачастую является единственным проявлением текущего инфекционного процесса. Поэтому у пациентов в состоянии нейтропении даже при отсутствии других клинических проявлений инфекционного процесса показанием для начала терапии антибиотиками являются: однократное повышение температуры тела  $> 38,5^{\circ} \text{C}$  при содержании нейтрофилов крови менее  $1 \times 10^9$  клеток в литре либо двукратное повышение температуры тела  $> 38^{\circ} \text{C}$ , измеренной с интервалом в 1 час при содержании нейтрофилов крови менее  $0,5 \times 10^9$  или менее  $1 \times 10^9$  клеток в литре с тенденцией к дальнейшему снижению их количества.

Выбор схемы терапии может определяться источником инфекции. Однако в ряде случаев выявить очаг инфекции при физикальном и инструментальном обследовании не удастся. Во всех случаях необходимо проведение

исследований крови на стерильность. В подавляющем большинстве случаев терапия начинается эмпирически, то есть до получения подтверждения инфекции бактериологическими методами. Основная роль принадлежит антибиотикам широкого спектра действия. Обязательным является использование лекарственных средств, направленных против грамотрицательных возбудителей, ввиду остроты и тяжести вызываемых ими инфекционных осложнений (таблицы 2, 3, 4).

Таблица 2 – Лекарственные средства, необходимые для лечения бактериальных инфекций

Лекарственное средство	Суточная доза	Кратность введения	Способ введения
Амоксициллин/Клавулановая кислота	100 мг/кг	3-4 раза в день	Внутривенно
Амикацин	15 мг/кг	3-4 раза в день	Внутривенно
Ко-тримоксазол	30-50 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Оксациллин	100-300 мг/кг	3-4 раза в день	Внутривенно
Ципрофлоксацин	5-10 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Левифлоксацин	500 мг	1-2 раза в день	Внутривенно
Цефотаксим	100-200 мг/кг	3-4 раза в день	Внутривенно
Амоксициллин	100-200 мг/кг	3-4 раза в день	Внутривенно
Полимиксин М	50-100 мг/кг	4 раза в день	Внутривенно
Эритромицин	10-30 мг/кг	3 раза в день	Внутривенно
Метронидазол	20-30 мг/кг	3 раза в день	Внутривенно
Цефтазидим	100 мг/кг	3 раза в день	Внутривенно
Гентамицин	5 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Офлоксацин	10 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Пиперациллин	200-300 мг/кг	4 раза в день	Внутривенно
Рифампицин	20-30 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Цефтриаксон	80 мг/кг	1 раз в день	Внутривенно
Имипенем+циластатин	60-90 мг/кг	4 раза в день	Внутривенно
Меропинем	20-40 мг/кг	3 раза в день	Внутривенно
Ванкомицин	40 мг/кг	2 раз в день	Внутривенно
Линезолид	1200 мг	2 раза в день	Внутривенно
Цефеперазон/Сульбактам	8000 мг	2 раза в день	Внутривенно



Таблица 3 - Лекарственные средства, необходимые для лечения грибковых инфекций

Лекарственное средство	Суточная доза	Кратность введения	Способ введения
Каспофунгин	50-70 мг	1 раз в день	Внутривенно
Флуконазол	8 мг/кг	1 раз в день	Внутривенно
Амфотерицин В (липидный комплекс)	25 мг/кг	1 раз в день	Внутривенно
Вориконазол	8-12 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Микамицин	100 мг	1 раз в день	Внутривенно
Посакоаназол	400 мг	2 раза в день	Внутрь

Таблица 4 - Лекарственные средства, необходимые для лечения вирусных инфекций

Лекарственное средство	Суточная доза	Кратность введения	Способ введения
Ганцикловир	10 мг/кг	2 раза в день	Внутривенно
Вальганцикловир	1800 мг	2 раза в день	Внутрь

### Реакция «трансплантат против хозяина»

#### Лечение острой РТПХ.

*Терапия первой линии.* Наиболее важным прогностическим фактором долгосрочного выживания является первичный ответ РТПХ на терапию. Метилпреднизолон в дозе 2 мг / кг / сут является лучшей первичной терапией для острой РТПХ. Терапия, связанная с ингибированием кальциневрина, назначается в течение 7 - 14 дней, с последующим медленным снижением доз до отмены при получении полного ответа на лечение. Полный ответ наблюдается у 25 - 40% пациентов со II – IV степенью проявлений острой РТПХ. Тем не менее, вероятность ответа уменьшается с увеличением тяжести заболевания и динамика ответов может отличаться между органами-мишенями, а также между пациентами. Неудача терапии, как правило, определяется как прогрессирование в течение 3 дней, или отсутствие положительной динамики в течение 7 дней, или неполный ответ в течение 14 дней.

*Терапия второй линии.* Пациенты, у которых начальная терапия не удалась, получают вторичную терапию. Перечень препаратов, используемых для терапии стероид-резистентных форм острой РТПХ представлен в таблице 5.

Таблица 5 - Препараты, используемые в терапии стероид-рефрактерных форм острой РТПХ

Метилпреднизолон (2-5мг/кг)
Иммуносупрессирующие препараты: <i>Такролимус, Мофетила микофенолат, сиролимус (если не использовались для профилактики)</i>
Оральные неабсорбируемые стероиды (в случае вовлечения ЖКТ )
Антитимоцитарный глобулин
Моноклональные антитела: Анти IL-1 рецептор (CD25) антитела: <i>Инолиномаб, базиликсимаб, даклизумаб, денилейкин, дифитокс</i> Анти TNF $\alpha$ антитела: <i>Инфликсимаб, этанерсепт</i> Анти-CD52 антитела (широкоспецифичные антитела к Т-клеткам): <i>Алемтузумаб</i> Анти-CD147 антитела (антитела против активированных Т и В клеток): <i>АВХ / СВЛ</i> Анти-CD3 антитела (широкоспецифичные антитела к Т-клеткам): <i>Висилизумаб, ОКТЗ</i>
Ингибитор аденозин дезаминазы - <i>Пентостатин</i>
Экстракорпоральный фотоферез: <i>Супрессия Т-клеточной реактивности и секреции цитокинов; индукция регуляторных Т-клеток</i>
Мезенхимальные стволовые клетки: <i>Иммуномодулирующий и ткане –репарирующий эффект</i>

*Поддерживающая терапия.* Включают в себя желудочно-кишечный «отдых», парентеральное питание, заместительную терапию энтеральной потери жидкости, контроль боли и инфекционную профилактику. Тем не менее, несмотря на все профилактические меры, вирусные, бактериальные и грибковые инфекции являются наиболее частой причиной смерти пациентов с тяжелой острой РТПХ. Таким образом, исход острой РТПХ зависит от двух основных факторов: степени тяжести и ответа на лечение.

### Лечение хронической РТПХ

*Терапия первой линии.* Сочетание циклоспорина А и преднизолона является стандартом терапии для хронической РТПХ уже почти 20 лет . Диапазон начальной дозы стероидов составляет от 1 до 1,5 мг / кг / сут в течение 2 недель, затем доза медленно снижается в соответствии с ответом.

Длительность лечения зависит также от ответа, но продолжается, как правило, в течение почти 12 месяцев.

*Терапия спасения.* Для пациентов с неудачами первичного лечения нет стандартной терапии второй линии. Разработаны различные подходы, в том числе низкие дозы общего лимфоидного облучения, PUVA-терапия, экстракорпоральная фотохимиотерапия, использование мофетила микофенолата, такролимуса и талидомида, ритуксимаба (анти-CD20 моноклональные антитела), сиролимуса, пентостатина.