

**Федеральный Научно-Клинический Центр  
Детской Гематологии, Онкологии и Иммунологии  
Росздрава**

**ПРОТОКОЛ АПЛАЗИЯ 2008**

**КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИОБРЕТЕННЫХ  
АПЛАСТИЧЕСКИХ АНЕМИЙ У ДЕТЕЙ АНТИТИМОЦИТАРНЫМ ГЛОБУЛИНОМ,  
ЦИКЛОСПОРИНОМ А И ПЕГИЛИРОВАННЫМ ФИЛГРАСТИМОМ**

Дата начала протокола \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/2008 года

Дата окончания протокола \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/2008 года

**Руководитель протокола: д.м.н. профессор Масчан А.А.**

**Ведущие исследователи: к.м.н. Новичкова Г.А., к.м.н. Масчан М.А.,**

**Исследовательская группа: Байдильдина Д.Д., Хачатрян Л.А., Петрова У.Н.**

**Секретарь протокола: Сеницына В.И.**

**Протокол Аплазия 2008 является продолжением предыдущего протокола, исследовавшего эффективность комбинированной ИСТ при приобретенных АА у детей.**

**По сравнению с предыдущим протоколом внесены следующие изменения:**

- 1. Введен пегилированный филграстим**
- 2. Увеличен минимальный срок лечения циклоспорином А за счет более медленных темпов снижения препарата**

**Протокол одобрен ученым советом НКЦ ДГОИ \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/2008 года**

**Протокол одобрен этическим комитетом \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/2008 года**



## **Введение**

**Приобретенная апластическая анемия** определяется как «различной выраженности панцитопения, не имеющая тенденции к спонтанному восстановлению, при сниженной клеточности костного мозга, не сопровождаемая гепатоспленомегалией, при отсутствии цитологических, цитогенетических и молекулярно-генетических признаков миелофиброза, острого лейкоза или МДС». К этому определению стоит добавить и отсутствие генетической детерминированности АА, понимая под этим отсутствие дефекта генов, ответственных за пролиферацию и антиапоптотические механизмы гемопоэтических предшественников.

Из приведенного определения становится очевидным, что диагноз приобретенной АА – это диагноз исключения, формальная документация которого требует достаточно широкого круга лабораторных исследований.

## **Эпидемиология АА**

Апластическая анемия является редким заболеванием. В Европе частота АА, по данным крупного исследования проведенного в 1980-1984 годах и охватившего популяцию 112 миллионов человек в год, составила 2 случая в год на 1 миллион. В то же время, в странах Дальнего Востока частота апластической анемии в несколько раз выше. Возрастное распределение частоты АА неравномерное: например, во Франции оно имеет небольшой пик после 60 лет, а в Юго-Восточной Азии значительный пик приходится на подростковый возраст.

В качестве объяснения таких особенностей географического и возрастного распределения частоты АА предлагается воздействие пока неидентифицированных факторов внешней среды, возможно инфекционной природы. Факторами, ассоциированными с риском развития АА, являются плохие бытовые условия и низкий доход, занятие культивированием риса (с сопряженным риском контакта с насекомыми, гербицидами и инсектицидами), профессиональный контакт с растворителями и перенесенный в прошлом гепатит А. Генетические факторы как таковые не играют, по всей вероятности, решающей роли, поскольку, например, среди японцев, проживающих на Гавайях, частота развития АА значительно ниже частоты АА в Японии.

## **Классификация и этиология апластических анемий.**

Современная классификация приобретенных трехростковых аплазий построена по этиологическому принципу.

## **Классификация приобретенных АА.**

Идиопатические апластические анемии

Вторичные апластические анемии

**Ионизирующее излучение**

**Лекарства и токсины**

Вызывающие дозозависимую АА

Вызывающие идиосинкратические АА

**Поствирусные**

Гепатит

Вирус Эпштейна-Барр

Вирус иммунодефицита человека

Парвовирус В19 у б-х иммунодефицитом

**На фоне иммунных заболеваний**

Гипогаммаглобулинемия (ОВИН, с-м Ниймеген)

Эозинофильный фасциит

Болезнь «трансплантат против хозяина»

Тимома и карцинома тимуса

**Пароксизмальная ночная гемоглобинурия**

Как видно из приведенной классификации, к развитию приобретенной апластической анемии способно приводить множество внешних и внутренних этиологических факторов.

По данным крупных публикаций из Европы и Северной Америки, анализирующих результаты лечения многих сотен пациентов с АА, 80-87% апластических анемий являются идиопатическими.

Среди АА с известной этиологией самой частой формой является гепатит-ассоциированная АА, на которую приходится около 12% всех случаев АА, по данным Европейских исследований. В целом показано, что географическое распределение случаев ГААА неоднородно - самая высокая частота заболевания фиксируется в Юго-Восточной Азии и Китае, примерно в 3 раза превышая таковую в Европе и Северной Америке. Гепатит-ассоциированной апластической анемией чаще страдают мальчики и молодые мужчины, у которых тяжелая панцитопения развивается от нескольких дней до полугода – в среднем через 2 месяца после эпизода острого гепатита. Тяжелая костно-мозговая недостаточность, как правило, развивается остро и без лечения заболевание является фатальным. К настоящему времени ясно, что ни один из известных гепатотропных вирусов - А, В, С, Е, G, F, TTV, ЦМВ, ЭБВ, парвовирус В19 не имеет отношения к развитию ГААА. По всей вероятности, финальный механизм развития ГААА является иммуноопосредованным и идентичен таковому при идиопатических и «идиосинкратических» лекарственно-ассоциированных АА.

Интересен вопрос, касающийся роли различных лекарственных препаратов как этиологических агентов АА. Даже среди гематологов бытует мнение, что лекарственные препараты являются весьма частой причиной аплазий. Список препаратов, способных

вызывать аплазию кроветворения, традиционно возглавляемый хлорамфениколом (левомицетином), насчитывает десятки веществ, наиболее часто цитируемыми среди которых являются следующие препараты.

### **Лекарственные препараты, вызывающие развитие трехростковой АА**

#### **Сильная ассоциация с развитием АА**

Хлорамфеникол  
Препараты золота  
Гидантоины  
Фенилбутазон  
Пеницилламин  
Хинакрин

#### **Немногочисленные случаи**

Сульфаниламиды  
Фенотиазины  
Индометацин  
Тиазиды  
Триметоприм  
Пириметамин  
Тиосемикарбазон  
Перхлорат калия  
Циметидин  
Производные хлорохина  
Антитиреоидные препараты

Проблема интерпретации ассоциации тех или иных лекарственных препаратов с развитием приобретенной АА весьма непростая. Классическим примером может служить история хлорамфеникола - препарата, который в медицинском сообществе имеет устойчивую репутацию самого опасного в отношении развития АА. Так с 1949 по 1952 год из 296 смертельных случаев АА, зарегистрированных в США, 47% были отнесены на счет хлорамфеникола. С течением времени и изменением источника получения информации (свидетельства о смерти, выписки из истории болезни или описания аутопсий) частота «хлорамфениколовых» аплазий стала снижаться во всех странах, независимо от того было в них запрещено применение препарата или нет. В одном из исследований, проведенных в Европе и Израиле, спланированном по принципу «случай-контроль», частота АА, ассоциированных с приемом хлорамфеникола была оценена в 0%. Подобная же история случилась и с дипирином, которому в 70-х годах в эмоциональных дискуссиях в европейской литературе отводилась роль важного этиологического агента при АА. К настоящему времени применение дипирина практически полностью прекращено, а частота развития аплазий в Европе за это время не изменилась. Эти примеры иллюстрируют всю сложность подхода к интерпретации этиологии АА. Причинами ошибочной диагностики тех или иных лекарственно обусловленных АА являются:

## Редкость АА

Скудость, отрывочность и неточность литературных данных

«Мода», заставляющая из нескольких препаратов принимаемых пациентом выбирать в качестве предполагаемого причинного агента именно тот, этиологическая роль которого более всего обсуждается в литературе

Как видно из приведенных Европейским регистром данных, случаев АА, ассоциированных с другими причинами (не лекарственные препараты или гепатит) регистрируется очень мало (~1% от общего числа аплазий).

## Патофизиология АА.

Теоретически, панцитопения может быть результатом как дефицита гемопоэтических предшественников и/или их сниженного пролиферативного потенциала, так и сниженной способности стромального микроокружения костного мозга поддерживать адекватную потребностям, сбалансированную дифференцировку и пролиферацию стволовых клеток. Действительно, опубликованы немногочисленные работы, показывающие, что функция стромы при АА постоянно нарушена. Однако, недавние исследования, изучавшие состояние костномозгового микроокружения у больных АА, показали, что фундаментальные функции стромы у них не нарушены – она секретирует нормальное количество ростовых факторов спонтанно или в ответ на специфическую стимуляцию интерлейкином-1, и обладает способностью поддерживать долгосрочные культуры костного мозга. Самым ярким доказательством нормальной функции костномозгового микроокружения служит факт быстрого приживления костного мозга от однойцового близнеца примерно у 50% случаев больных АА без какого-либо кондиционирования

Вся современная патофизиологическая концепция АА берет свое начало из клинического наблюдения, сделанного в 1969 г G. Mathé с соавторами, описавших восстановление собственного (не донорского!) гемопоэза у пациентов с АА, которым предпринималась попытка трансплантации HLA-несовместимого костного мозга с профилактикой отторжения антилимфоцитарной сывороткой (АЛГ). Эти случаи прямо указали на вероятное вовлечение иммунных механизмов в патогенез АА. Важными клиническими аргументами, побудившими к поиску единого патофизиологического механизма развития аплазий, явились и успехи в лечении лекарственных и постгепатитных АА с помощью иммуносупрессивной терапии. В течение прошедших трёх десятилетий было накоплено огромное количество доказательств того, что за вычетом панцитопений, развивающихся в результате применения цитостатиков и ионизирующего облучения, практически все случаи АА являются если и не аутоиммунными заболеваниями в чистом виде, то уж, по крайней мере, иммуноопосредованными синдромами.

В качестве лабораторных доказательств роли активированных участников иммунного ответа в патогенезе АА можно привести следующие факты:

1. Улучшение роста миелоидных и эритроидных колоний костного мозга больных АА в культуре после удаления лимфоцитов, добавления антилимфоцитарной сыворотки или моноклональных анти Т-клеточных антител.
2. Обнаружение CD8<sup>+</sup> опосредованного подавления гемопоэза при АА.
3. Циркуляция повышенного количества активированных Т-лимфоцитов супрессоров при гепатит-ассоциированной АА.
4. Высокая продукция интерлейкина-2 лимфоцитами больных АА и нормализация ее после успешной иммуносупрессивной терапии.
5. Инфильтрация Т-лимфоцитами фокусов резидуального гемопоэза в костном мозге больных АА.

Следующей важной группой доказательств иммунноопосредованного патогенеза АА является повышенная продукция иммунных цитокинов – IL-2,  $\gamma$ -интерферона и TNF- $\alpha$  при АА. Известно, что именно два последних цитокина обладают способностью подавлять колониобразующую способность костномозговых предшественников и, более того, наблюдается синергизм между ними в отношении ингибиции гемопоэза *in vitro*. Серией исследований обнаружены повышенные уровни  $\gamma$ -интерферона и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови и костного мозга больных АА, также как их повышенная продукция мононуклеарами периферической крови или костного мозга. Интересно, что экспрессия гена  $\gamma$ -интерферона была обнаружена в костном мозге у подавляющего числа больных с АА, в то время как ни одного больного с миелодиспластическими синдромами, конституциональными аплазиями или острыми миелоидными лейкозами ген  $\gamma$ -интерферона экспрессирован не был.

Поскольку биологические эффекты фармакологических доз всех перечисленных цитокинов испытывались как на здоровых добровольцах, так и в клинических исследованиях, небезынтересно отметить, что, хотя более или менее выраженное снижение показателей периферической крови (главным образом тромбоцитов и гемоглобина) было весьма типичным, апластических анемий не было зарегистрировано ни у одного пациента, у которых применялся интерлейкин-2,  $\gamma$ -интерферон или TNF- $\alpha$ . Несмотря на очень высокие уровни вышеперечисленных цитокинов в периферической крови, достигаемые при применении фармакологических дозировок, сниженные на фоне терапии показатели крови возвращались к норме после прекращения лечения. В то же время тяжёлая панцитопения при АА, вовсе не имеет тенденции к спонтанному восстановлению. Кстати, случаи развития апластической анемии, успешно леченой АТГ, описаны при лечении ХМЛ и лимфом  $\alpha$ -интерфероном. Исследования, проведенные NS Young с соавторами объяснили



причину такого несоответствия и позволили предложить патогенетическую схему, которая суммирует современное состояние понимания феноменологии апластических анемий. На модели долгосрочных культур костного мозга было показано, что если в долгосрочной культуре клетки стромы конституционально секретируют низкий уровень  $\gamma$ -интерферона, то они способны подавлять рост гемопоэтических колоний при концентрации цитокина в надосадочной жидкости в 100 (!) раз меньшей, чем при добавлении его извне. Это напрямую указывает на влияние мембранносвязанных форм цитокинов. Кроме этого было показано, что  $\gamma$ -интерферон и TNF- $\alpha$  индуцируют экспрессию FAS-рецептора на гемопоэтических предшественниках, потенцируя тем самым апоптоз в пуле стволовых клеток. Был продемонстрирован и феномен повышения количества клеток-предшественников, находящихся в процессе запрограммированной клеточной смерти в костном мозге больных с АА, причём, чем тяжелее была аплазия, тем больше стволовых клеток находилось в состоянии апоптоза. Экстраполируя данные вышеприведенных исследований, предлагается следующая схема развития АА.

1. Повреждение гемопоэтических стволовых клеток вирусами, лекарственными препаратами или токсинами с экспрессией либо вирусных, либо неоантигенов.
2. Активация костномозговых антигенпрезентирующих клеток, взаимодействующих с наивными Т-лимфоцитами с образованием антигенспецифических цитотоксических эффекторов.
3. Секреция цитотоксическими эффекторами  $\gamma$ -интерферона и TNF- $\alpha$ , которые вызывают индукцию экспрессии Fas-антигена на поверхности стволовых клеток, а также ингибируют пролиферацию коммиттированных предшественников.
4. Секреция цитотоксическими эффекторами Fas-лиганда и индукция массивного апоптоза в пуле гемопоэтических предшественников, результатом чего является снижение количества последних до такого уровня, который не способен поддерживать адекватную продукцию зрелых клеточных элементов периферической крови.

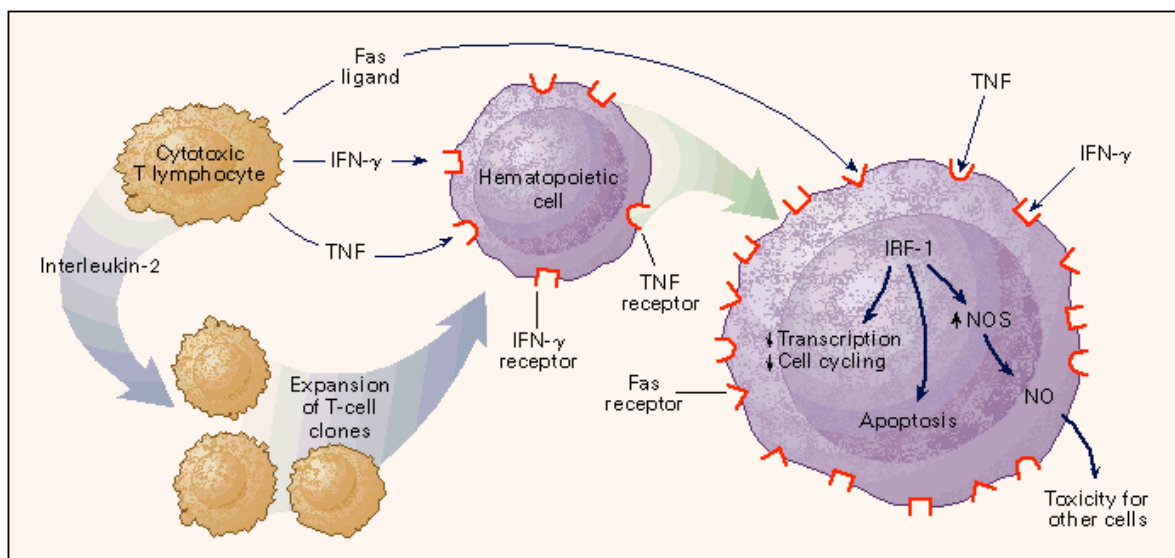


Рисунок 1. Индукция апоптоза гемопоэтических стволовых клеток при взаимодействии с активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами. IFN- $\gamma$  - интерферон гамма, TNF-фактор некроза опухоли, IRF 1 – интерфероновый фактор регуляции 1, NO – оксид азота. (из Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia . N Eng J Med 1997, 336:13651-372 )

### Клинические симптомы, диагностика и критерии тяжести АА.

Хотя ретроспективными исследованиями установлено, что средний интервал от воздействия этиологического агента (вируса, лекарственного препарата) до возникновения панцитопении составляет 6-8 недель, АА может дебютировать как сверхостро, так и практически незаметно. Иногда пациенты могут назвать день появления первых симптомов заболевания, а иногда при сборе анамнеза выясняется, что аномальная кровоточивость и симптомы анемии присутствуют в течение нескольких месяцев, а то и лет. Наиболее точно удастся проследить становление апластической анемии при гепатит-ассоциированных формах, когда панцитопения развивается вслед за клинически «ярким» тяжелым гепатитом. Симптомы апластической анемии напрямую связаны со степенью снижения трёх важнейших показателей периферической крови – гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов. Подавляющее большинство больных АА обращается за медицинской помощью по поводу кровоточивости, причём жизнеугрожающие кровотечения в качестве первого клинического проявления болезни встречаются очень редко. В типичных случаях речь идет о кровоточивости десен, носовых кровотечениях и легко, в результате микротравм, возникающих экхимозах и петехиальной сыпи.

Серьёзные висцеральные кровотечения – желудочно-кишечные, почечные и внутричерепные возникают позже. Анемический синдром проявляется легкой утомляемостью, шумом в ушах, ощущением пульсации в голове, усталостью и другими

классическими симптомами. Как правило, дети хорошо переносят даже очень тяжелую анемию. По данным литературы, тяжёлые инфекции редко являются первыми симптомами болезни, хотя по нашим данным это не совсем так - тяжелые бактериальные инфекции, равно как и инвазивные микозы могут стать первым же инфекционным эпизодом. Нехарактерным для АА являются снижение веса, гепатоспленомегалия, лимфаденопатия и боли в костях; – наличие любого из этих симптомов заставляет искать другую причину панцитопении.

### **Необходимые исследования и лабораторные характеристики АА**

Для диагностики приобретенной АА необходимо выполнение следующих исследований:

Серия анализов крови на автоматическом анализаторе с обязательным определением ретикулоцитоза и ручным подсчетом лейкоцитарной формулы

Биохимический анализ крови с определением аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы, билирубина, мочевины, креатинина

Миелограмма из трех анатомически различных точек

Трепанобиопсия костного мозга

Проба на гиперчувствительность лимфоцитов к диэпоксидбутану

Факультативными исследованиями, которые проводятся при наличии особых показаний являются:

Цитогенетическое исследование костного мозга\*

Иммунофенотипирование лейкоцитов костного мозга и периферической крови

Проба Хэма

\*Проведение цитогенетического исследования костного мозга весьма полезно, поскольку может помочь выявлению минорных предлейкемических клонов, однако предъявляет особые требования к качеству выполнения и интерпретации результатов.

Типичным для АА является одновременное снижение показателей производных всех трёх главных ростков костномозгового кроветворения – эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов, несмотря на различную кинетику зрелых элементов крови. У большинства пациентов число лимфоцитов и моноцитов также снижено, хотя абсолютный лимфоцитоз не является такой уж редкостью. При исследовании мазка периферической крови нередко выявляется токсическая зернистость нейтрофилов и нарушения морфологии эритроцитов. При автоматическом анализе зачастую выявляется макроцитоз эритроцитов, а размер тромбоцитов обычно нормальный. Абсолютное число ретикулоцитов не адекватно тяжести анемии. Для АА характерно небольшое повышение фетального гемоглобина вкупе с макроцитозом, что классически квалифицируется как характеристика «стрессового гемопоэза». У пациентов с постгепатитной АА в дебюте панцитопении отмечается

различной степени, иногда значительное, повышение активности сывороточных трансаминаз, которая чаще всего вскоре приходит в норму. У больных с синдромом *аплазия/пароксизмальная ночная гемоглобинурия* выявляется более высокий ретикулоцитоз, зачастую повышение билирубина, лактатдегидрогеназы и положительная проба Хэма.

Состояние костного мозга при АА должно быть оценено как по данным аспирата из нескольких точек, так и по данным трепанобиопсии. По данным пунктата оценивается наличие лейкемических или иных опухолевых клеток, а также морфология резидуальных элементов эритро-, грануло- и мегакариопоэза. Дизэритропоэз является весьма частой находкой при АА; типично выявление «мегалобластоидности» эритроидных элементов, асинхронии созревания ядра и цитоплазмы эритробластов – эти признаки очень трудно дифференцировать с дисплазией эритроидного ряда, выявляемой при миелодиспластических синдромах. Зачастую, особенно в дебюте АА при ее «острой» презентации в пунктате выявляется повышение количества плазматических клеток и макрофагов с явлениями эритрофагоцитоза. Истинная клеточность костного мозга не может быть оценена по данным миелограммы, поскольку при аспирации существует вероятность получения весьма клеточного костного мозга из «горячих карманов» кроветворения и, соответственно, неверной интерпретации причины панцитопении. Наилучшим образом клеточность оценивается с помощью трепанобиопсии костного мозга. У детей клеточность кроветворного костного мозга из задних гребней подвздошных костей составляет в среднем 80% с разбросом 60-100%. Соответственно, у детей клеточность ниже 50% является критерием гипоплазии кроветворения. Известно, что с возрастом содержание кроветворного костного мозга падает и, соответственно, клеточность должна оцениваться относительно возрастной нормы. Хотя у подавляющего большинства пациентов с АА клеточность костного мозга чрезвычайно низка, у небольшого числа больных она может быть снижена незначительно или не снижена вовсе, однако подавляющее большинство клеточных элементов в таких случаях составляют лимфоциты.

## Интерпретация данных лабораторных исследований при АА

Исследование	Важная информация, подлежащая оценке и анализу	Находки, не имеющие диагностического значения или не подлежащие анализу
Анализ крови	Количественные показатели нейтрофилов, тромбоцитов и ретикулоцитов, наличие аномальных клеточных популяций	Абсолютный и относительный лимфоцитоз, нормобластоз, макроцитоз
Миелограмма	Отсутствие мегакариоцитов, дисмегакариопоз, выраженный дисгранулоцитопоз, наличие аномальных клеточных популяций	Дизэритропоз, повышение содержания макрофагов с явлениями гемофагоцитоза, повышение содержания плазматических клеток, клеточность
Трепанобиопсия	Клеточность, миелофиброз, лимфоцитарная инфильтрация, инфильтрация негемопозитическими элементами, при соответствующей обработке – локализация предшественников	Морфология остаточных элементов гемопоэза
Иммунофенотипирование	Выявление лимфоидных клеток с «лейкемическим» фенотипом Выявление клеток «волосатоклеточного лейкоза» Маркеры негемопозитических опухолей	Повышение количества активированных лимфоцитов

### Классификация АА по тяжести течения.

Любая классификация заболевания по тяжести имеет целью выделить группы больных, имеющих различный прогноз и различным образом реагирующих на стандартное лечение. В 1976 и 1979 году Брюсом Камиттой с соавторами была выделена группа простейших показателей периферической крови и костного мозга, определяющих тяжесть течения заболевания и прогноз больных АА. Эти критерии давно уже стали классическими и используются повсеместно.

#### Критерии тяжёлой формы АА

Клеточность костного мозга по данным трепанобиопсии <25% (или клеточность <50% при клеточности нелимфоидных элементов костного мозга <30%) и 2 или более из следующих показателей:

- Нейтрофилы <500/мкл
- Тромбоциты < 20000/мкл
- Корригированный ретикулоцитоз <1% (менее 40 000/мкл)

В дальнейшем, используя вышеуказанные критерии, была выделена сверхтяжёлая форма АА, для которой характерны те же показатели, что и для тяжёлой, но с числом нейтрофилов < 200/мкл. Остальные случаи квалифицируются как нетяжёлая форма АА (умеренная АА, среднетяжёлая АА)

В анализе, проведенном Камиттой 90% больных с тяжелыми АА, которые лечились андрогенами и гемотрансфузиями умирали в течение первых шести месяцев после установления диагноза АА

Кроме общепринятых критериев Камитты разными исследователями вносились дополнения в прогностическую систему, призванные наиболее точным образом вычленивать группы с более и менее тяжелым течением АА. В качестве дополнительных критериев тяжести назывались следующие показатели: ретикулоцитоз  $< 10\,000/\text{мкл}$  и  $< 5000/\text{мкл}$ , самые низкие показатели крови в течение заболевания, низкое число ретикулоцитов в сочетании с прогрессирующей нейтропенией, быстрое падение показателей крови, выраженный лимфоцитоз костного мозга. Тем не менее, несмотря на множество попыток, более точной, воспроизводимой и практичной стратификации, нежели элементарная система Камитты предложено не было, и последняя заслуженно остается в ходу уже три десятилетия. Следует заметить, что любая попытка субклассифицировать относительно мономорфные в плане этиологии и патофизиологии синдромы прежде всего преследует цель выделить группы, различные в прогностическом отношении и требующие дифференцированного лечения, поэтому каждая такая система отражает не только и не столько тяжесть самого заболевания, сколько имеющиеся в данный период времени возможности повлиять на его естественное течение. Иными словами – критерии тяжести зачастую определяются не самим заболеванием, а возможностями проведения (или вообще существованием) адекватного лечения. Именно таким образом дело обстоит с АА – большинство прогностических систем предложено до разработки оптимального на сегодня консервативного лечения и появления возможностей проведения адекватных сопроводительных мероприятий - рациональной трансфузионной поддержки высококачественными препаратами тромбоцитов и эффективной антимикробной терапии. Сегодня с помощью современной сопроводительной терапии можно добиться длительной выживаемости подавляющего большинства больных с АА даже в отсутствии специфического лечения, поэтому система Камитты в известной мере утратила свое прогностическое значение в отношении выживаемости больных и в большей степени служит для стратификации пациентов согласно требуемому объему и типу терапии – аллогенная ТКМ, иммуносупрессия, комбинированная иммуносупрессия в сочетании с ростовыми факторами.

### **Лечение приобретенных апластических анемий.**

Коль скоро причиной развития панцитопении при АА является иммуноопосредованное истощение пула и снижение пролиферативной способности гемопоэтических предшественников, то чисто теоретически, существует две возможности

коррекции АА – замещение недостающего количества стволовых клеток донорскими и стимуляция /снятие ингибции пролиферации резидуальных предшественников. И действительно, оба этих подхода широко применяются для лечения АА. В первом случае речь идет об аллогенной трансплантации костного мозга, во втором - об иммуносупрессивной терапии. Если в качестве критерия эффективности избрать долгосрочную выживаемость и отсутствие необходимости трансфузионной поддержки, то оба метода равноэффективны в лечении АА.

### **Трансплантация костного мозга.**

Первое сообщение о трансплантации костного мозга от HLA- идентичных сиблингов у 4-х пациентов с приобретенной АА, двое из которых полностью выздоровели было опубликовано Д. Томасом с соавт в журнале Lancet в 1972 году. В наши дни трансплантация костного мозга стала рутинным лечением АА. Наряду со способностью трансплантации костного мозга полностью восстановить гемопоэз у больных АА, в этой работе были продемонстрированы и проблемы, связанные с процедурой ТКМ - отторжение трансплантата и острая реакция «трансплантат-против-хозяина». По данным Европейского Регистра по Трансплантации Костного Мозга (EBMTR) и Международного регистра по трансплантации костного мозга в Европе и Северной Америке ежегодно проводится около 700 трансплантаций у пациентов с апластическими анемиями. Общая долгосрочная выживаемость среди трансплантированных больных составляет 61-94% по сообщениям разных групп, а по данным Европейского и Международного регистров по ТКМ – 63%. При анализе регистров и отдельных групп видно, что выживаемость больных с АА после ТКМ улучшилась с 40-45% в 70-е годы, до 80-90% в период после 1988 года. У больных с АА принципиальное влияние на результаты аллогенной ТКМ (как интегральный показатель успеха используется выживаемость больных) оказывают следующие факторы:

1. Приживление трансплантата
2. Осложнения раннего посттрансплантационного периода
  - Острая РТПХ (и ассоциированные с ее лечением инфекции)
  - Непосредственная токсичность в раннем периоде после ТГСК (инфекции, интерстициальная пневмония)
3. Осложнения позднего посттрансплантационного периода
  - Хроническая РТПХ
  - Опухоли

Высокий уровень отторжения трансплантата в течение двух десятилетий оставался главным препятствием для успешной ТКМ при АА. Чисто теоретически, у больных апластическими анемиями, учитывая незлокачественный характер заболевания и очевидное

опустошение костного мозга, высокотоксичного миелоаблативного кондиционирования с целью «расчистки плацдарма» для донорского кроветворения не требуется. И действительно, подавляющее большинство больных с АА традиционно трансплантировалось после проведения немиелоаблативного кондиционирования. Обязательным компонентом всех режимов являлся циклофосфамид в дозе 200 мг/кг, а в качестве дополнительных компонентов зачастую использовался АТГ и, реже, прокарбазин. Однако, несмотря на теоретические предпосылки, немиелоаблативные режимы исторически были ассоциированы с высоким риском отторжения. Так из 46 описанных группой из Сиэттла больных с АА, кондиционированных циклофосфамидом 200 мг/кг у которых достигнуто приживание костного мозга, у 13 зарегистрировано его последующее отторжение. Та же группа в 1982 году при анализе результатов ТКМ у 175 больных АА сообщила, что отторжение костного мозга произошло у 38 (23%), а по данным Европейской группы трансплантации костного мозга трансплантат отторгли 85 (16%) больных АА среди 618, трансплантированных с 1976 по 1990 год. Среди 108 детей, трансплантированных после кондиционирования циклофосфамидом в Сиэттле с 1971 по 1991 год отторжение трансплантата произошло у 24 (22%). В то же время, при ужесточении режима кондиционирования одним из видов облучения тела (тотальное облучение, торакоабдоминальное облучение, тотальное лимфоидное облучение), риск первичного неприживания или отторжения был существенно ниже. Так, по данным IBMTR, частота отторжения трансплантата после кондиционирования циклофосфамидом с тотальным облучением тела или облучением ограниченных полей (limited field irradiation), была в три раза ниже, чем у больных, получивших кондиционирование только циклофосфамидом. Общая частота отторжения трансплантата после использования режимов с облучением тела составляет 2-3%, хотя доза облучения, по всей вероятности, оказывает влияние на вероятность приживания. Так низкая доза 3 Гй, использовавшаяся группой из Лос-Анжелеса, оказалась недостаточной, чтобы предотвратить отторжение у 4-х из 25 больных. Кроме облучения тела выраженной способностью подавлять отторжение трансплантата у политрансфузированных больных обладают живые лимфоциты донора, перелитые в составе т.н. лейкоцитарной пленки (*buffy coat*) одновременно с трансплантатом костного мозга, однако цена этого сокращения риска отторжения – значительное повышение риска экстенсивной хронической РТПХ. Анализ риска отторжения трансплантата у пациентов с АА идентифицировал следующие факторы:

- Т-деплеция трансплантата (относительный риск 10.8)
- Высокая трансфузионная нагрузка (относительный риск 2.9)



- Отсутствие применения циклоспорина А после ТКМ для профилактики РТПХ (относительный риск 2.3)

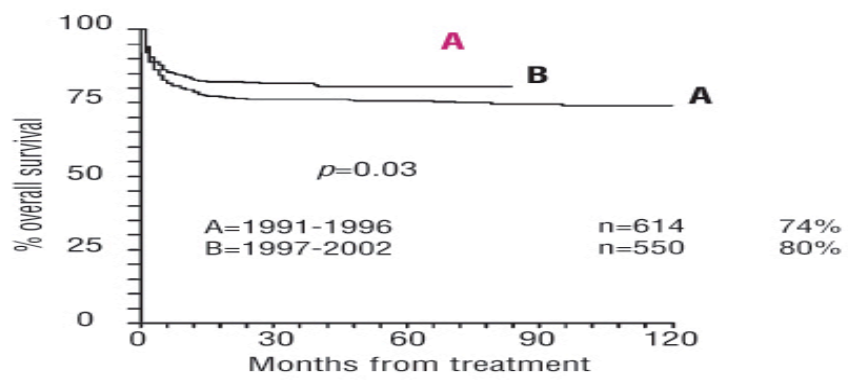
В других, более ранних работах, посвященных этой же проблеме, назывались и другие факторы риска:

- Низкое число трансплантированных миелокариоцитов ( $<3 \times 10^8/\text{кг}$ )
- Положительный пролиферативный ответ лимфоцитов реципиента против лимфоцитов донора в смешанной культуре
- Мужской пол донора
- Отсутствие инфузии buffy coat

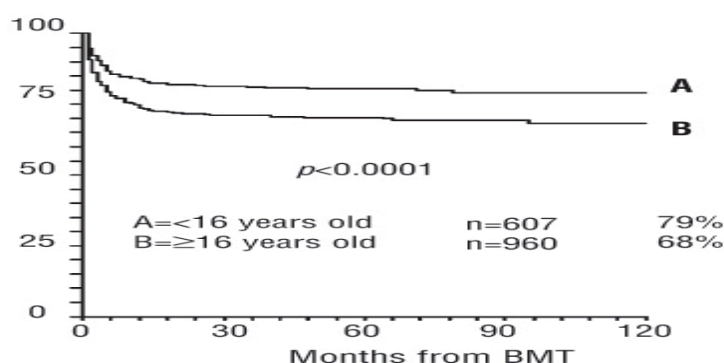
Риск отторжения трансплантата резко снизился в течение последних 20 лет. По данным группы из Сиэттла среди 392 пациентов трансплантированных по поводу АА с 1970 по 1991 год с кондиционированием только циклофосфамидом частота отторжения упала с 35% до 3%. Похожая динамика зафиксирована и Европейской группой по трансплантации костного мозга.

Одним из предложенных объяснений снижения частоты отторжения является внедрение использования циклоспорина А в программу профилактики РТПХ в начале 80-х годов, однако это не получило подтверждения в других работах. Неясно и влияние количества трансплантированных миелокариоцитов, равно как неподтвержденными остались данные о влиянии пола донора и положительной реакции лимфоцитов в смешанной культуре. Несмотря на, казалось бы, доказанное влияние увеличения количества трансфузий на повышение риска отторжения костного мозга, необходимо помнить, что трансфузионная практика претерпела значительные изменения в последние 10 лет.

Последний крупный анализ результатов лечения больных АА опубликован в 2007 году Европейским регистром в журнале Haematologica. В этом анализе показано, что общая выживаемость в группе трансплантированных значительно выросла за последние десять лет, причем результаты трансплантаций у детей существенно лучше, чем у взрослых. Интересно отметить, что большинство пациентов с АА получали кондиционирование без АТГ, хотя в этом же исследовании показан убедительный тренд к уменьшению риска отторжения при использовании последнего.

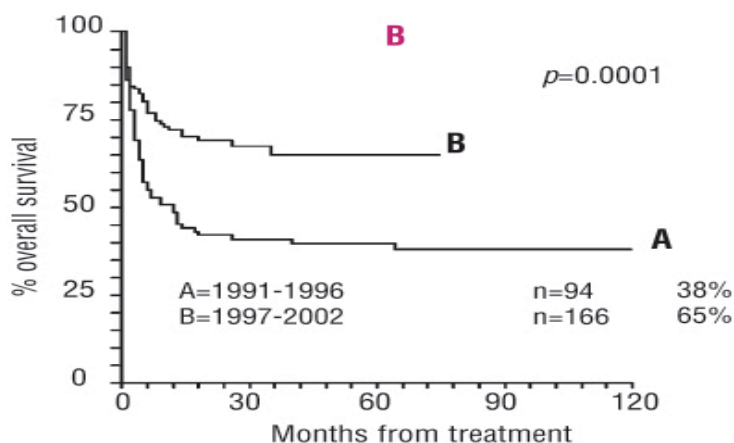


Общая выживаемость пациентов с АА, трансплантированных с 1991 по 1996 и 1997-2002  
Haematologica 2007,92(1)11-18



Общая выживаемость трансплантированных пациентов с АА в зависимости от возраста  
Haematologica 2007,92(1)11-18

Говоря о ТКМ при АА, нельзя обойти вниманием и результаты трансплантаций от HLA-совместимых неродственных доноров и неполностью совместимых родственных доноров. Результаты этих трансплантаций трудно напрямую сравнивать с трансплантациями от HLA-совместимых родственных сиблингов, хотя бы потому, что эти трансплантации предпринимаются у больных с заведомо худшим прогнозом – не ответивших на несколько курсов иммуносупрессии, политрансфузированных, возможно сотягощенным инфекционным анализом и т.д. До 2002 года результаты неродственных трансплантаций были неизмеримо хуже геноидентичных трансплантаций, однако внедрение подбора неродственных доноров на основе высокоточного ДНК-типирования, появление новых режимов иммуносупрессии и высокоэффективных методов лечения инфекций позволили значительно улучшить прогноз реципиентов неродственных пересадок.



Общая выживаемость пациентов с АА, трансплантированных от неродственного совместимого донора с 1991 по 1996 и 1997-2002

### **Иммуносупрессивная терапия апластических анемий**

#### **Антилимфоцитарный и антитимоцитарный глобулины.**

Честь открытия современной эры иммуносупрессивной терапии по праву принадлежит Жоржу Матэ с соавторами, которые в конце 60-х годов зафиксировали аутологичную реконституцию гемопоэза у двух больных с АА, получивших кондиционирование антилимфоцитарным глобулином перед инфузией аллогенного HLA- несовместимого костного мозга. В качестве АТГ в работах Матэ использовался лошадиный препарат, полученный Бруно Спеком в университетской клинике Базеля. Находка Матэ, и результаты последовавшего за этим европейского исследования Speck с соавт, которые, используя тот же АТГ(Lymposer) добились нормализации или улучшения показателей крови у 12 больных АА из 29 положили начало новой эпохи в лечении пациентов с АА. Примечательно, что как это часто случалось в те годы, в США данные об эффективности АТГ при АА были полностью проигнорированы. Тем не менее, в дальнейшем именно в США проведены первые рандомизированные исследования эффективности терапии АТГ, окончательно доказавшие преимущества АТГ перед другими видами консервативной терапии, доступными в то время. Исследование Camitta с соавт показало преимущество терапии АЛГ (Lymposer) в сочетании с андрогенами против терапии андрогенами: 76% больных выжили в течение 1 года в группе АТГ против 31 % в группе пациентов, получавших только андрогены. Исследование Champlin с соавт продемонстрировало преимущество терапии лошадиным АТГ (ATGAM), перед сопроводительной терапией: гематологический ответ достигнут у 11 пациентов из 21 , инициально рандомизированных в группу АТГ, против 0 из 21 в группе сопроводительной терапии. Исследование Young с соавт сравнивало эффективность АТГ против андрогенов и выявило, что через 3 месяца от начала лечения 28% больных леченых АТГ достигли гематологического ответа, в то время как в группе андрогенов ответ не зарегистрирован ни у одного пациента. Таким образом, эффективность АТГ была доказана неопровержимо и терапия АТГ в качестве первой линии стала «золотым стандартом» лечения апластических анемий у молодых пациентов, не подлежащих ТКМ и у всех пациентов в возрасте старше 40 лет. Эти, а также более поздние исследования подтвердили эффективность антитимоцитарного глобулина в лечении АА на многих сотнях больных - частота гематологического ответа колебалась в пределах 30-70%, причём в Европе результаты терапии были неизменно лучше, чем в США. В качестве единственного прогностического фактора для достижения гематологического ответа, воспроизведенного всеми исследованиями, идентифицирована тяжесть аплазии – больные

со сверхтяжёлой аплазией имели худшие шансы на восстановление, чем больные с просто тяжёлой и, тем более, среднетяжёлой формой заболевания. Интересно, что качество достигнутого ответа (полный или частичный) не влияет на выживаемость. Вообще, следует подчеркнуть, что критерии гематологического ответа несколько разнятся от исследования к исследованию – например число тромбоцитов, необходимое для достижения критерия “полного” ответа колеблется от 80 000 до 120 000/мкл, а нейтрофилов от 1800 до 2500/мкл, поэтому и соотношение полностью и частично ответивших колеблется от 20 до 50%. Сегодня в качестве критериев “полного ответа” рекомендуется использовать критерии предложенные Согласительной конференцией рабочей группы по апластическим анемиям EBMT в Санта-Маргерите, 1997: Нв > 110 г/л, гранулоциты >2500/мкл и тромбоциты >150000/мкл.

### **Препараты антиtimoцитарных глобулинов**

В подавляющем числе исследований эффективности АТГ/АЛГ использовались препараты лошадиного – «Lymphoser» («Lymphoser», Швейцария), «Lymphoglobuline» (Франция) и «АТГАМ» (США). «Lymphoser» и «Lymphoglobuline» получают из сыворотки лошадей, иммунизированных лимфоцитами грудного протока, а «АТГАМ» – тимоцитами человеческих плодов. Значительно реже использовались кроличьи АТГ - «Thymoglobuline» (Франция) и некоммерческие препараты производства США и Голландии. Все АТГ/АЛГ содержат весьма широкий спектр антител, с реактивностью против как лимфоцитарных антигенов – так и антигенов других гемопоэтических и негемопоэтических клеток. Препараты АТГ разнятся методами процессинга полученной иммунной сыворотки – например, «Lymphoglobuline» сорбируется строной эритроцитов. Более чем 25-летний опыт применения АТГ/АЛГ выявил, что эффективность лечения не зависит от конкретного лота и длительности курса (длительность курса в разных исследованиях составляла от 4-х до 21 дня), а также от этиологии аплазии. Что касается дозы препарата, то следует отметить, что рандомизированных исследований различных дозировок не проводилось и в большинстве случаев использовались близкие дозировки –120-160 мг/кг на курс для «АТГАМ» (в одном исследовании 100 мг/кг), 160 мг/кг для «Lymphoser» и 50-75 мг/кг для «Lymphoglobuline». Влияние вида животного-производителя на эффективность терапии АТГ также неясно, поскольку кроличьи АТГ использовались в терапии первой линии достаточно редко. Единственное прямое перекрестное рандомизированное исследование в качестве препарата первой линии кроличьего АТГ (АТГ Фрезениус, курсовая доза 40 мг/кг) против лошадиного АТГ (АТГАМ, курсовая доза 160 мг/кг) проведено в нашей клинике и показало лучшие результаты в группе, получавшей АТГАМ (Масчан МА с соавт). В России также доступен АТГ козьего происхождения

(Антилимфолин Кз, Ин-т Геронтологии РАМН).

Глобализация мировой экономики, оказала серьезное влияние на рынок лекарственных препаратов. В последние годы мы стали свидетелями слияния фармацевтических компаний, следствием которых все чаще и чаще становится прекращение производства сложных в стандартизации и сертификации препаратов, направленных на лечение относительно небольших групп пациентов. Эта неприятная тенденция коснулась и рынка АТГ. Давно прекращено производство препарата Lymphoser, а с 2006 года остановлен выпуск Lymphoglobuline – единственного АТГ, «лицензированного» для лечения пациентов с АА в Евросоюзе. В этих условиях необходимы исследования эффективности и оптимальных дозировок АТГ, имеющихся в распоряжении. В частности в странах Западной Европы начинается исследование «Тимоглобулина» в первой линии иммуносупрессивной терапии пациентов с АА. Разовая доза составляет препарата 3,5 мг/кг, курсовая – 17,5 мг/кг (см. приложение).

#### **Качество гемопоэза и поздние осложнения после лечения АТГ**

Механизм, ответственный за эффективность АТГ при апластических анемиях никогда не был с точностью идентифицирован. В качестве объяснений, помимо собственно иммуносупрессивного действия (снижение содержания цитотоксических и активированных лимфоцитов, подавляющих эффективный гемопоэз), которое, несомненно, играет доминирующую роль в механизме действия АТГ, предлагались такие гипотезы как стимуляция продукции ростовых факторов мононуклеарами периферической крови, стимуляция пролиферации примитивных предшественников, протекция стволовых клеток от воздействия аутоагрессивных лимфоцитов, иммуномодуляция с индукцией толерантности к гемопоэтическим предшественникам и стимуляция продукции Т-регуляторных лимфоцитов. Можно с достаточной долей уверенности сказать, что эффект АТГ не связан с какой либо одной составляющей репертуара антител, ибо моноклональные анти Т-клеточные антитела - ОКТ3, T101 оказались абсолютно неэффективными в лечении АА.

Несмотря на то, что улучшение показателей периферической крови, соответствующее дефиниции «гематологического ответа» наблюдается более чем у половины больных АА после лечения АТГ, значительная часть из них так и не достигает нормальных анализов крови. Начало гематологического ответа после терапии АТГ регистрируется в среднем на 8-12 неделе терапии (разброс от 2 недель до > 1 года), и далее показатели крови продолжают постепенно повышаться, причём медленнее всего восстанавливается уровень тромбоцитов. Медиана интервала до достижения гематологического ответа составляет около 3-х месяцев после курса АТГ, соответственно половина ответивших пациентов

восстанавливается в более поздние сроки, вплоть до 12 и более месяцев после проведения АТГ. Вообще у очень многих пациентов нормализация показателей крови или выход их на «плато» может занимать не один год. В целом, для подавляющего большинства больных, достигших ремиссии после терапии АТГ, характерна персистенция количественных аномалий клеточных элементов периферической крови – содержание гемоглобина и нейтрофилов ниже, чем у здоровых людей, однако самой частой резидуальной аномалией является тромбоцитопения. Кроме того, закономерно выявляется макроцитоз и аномальная морфология моноцитов. При исследовании трепанобиоптата костного мозга даже при полной нормализации анализов крови, отмечается снижение общей клеточности; особенно страдает мегакариоцитарный росток.

Являются ли больные, достигшие гематологического ответа после терапии АТГ излеченными? Если даже отбросить резидуальные количественные аномалии тромбоцитов и понимать под термином «излечение» отсутствие необходимости в дальнейшей терапии по поводу АА и отсутствие риска для жизни и здоровья, проистекающего из последствий проведенного лечения, то все равно окажется, что значительное количество больных ответивших на АТГ не излечены полностью, независимо от интервала, прошедшего со времени проведения лечения АТГ. Две серьёзных опасности подстерегают ответивших на АТГ – рецидивы аплазии и развитие поздних клональных аномалий. Согласно ретроспективному исследованию EBMT 1993 года из 358 больных, достигших ремиссии после успешной иммуносупрессии АТГ, рецидивировало 74 (риск - 35,2% через 14 лет) со средним интервалом 778 дней. Интересно, что максимальный риск рецидива – 48,3% наблюдался среди больных, быстро ответивших на АТГ (до 120 дней), а минимальный (19,7%) – среди пациентов с поздним (свыше 360 дней) ответом. Ещё один важный вывод из этого исследования – прямая корреляция между поздним началом иммуносупрессии и риском рецидива: у рецидивировавших больных средний интервал диагноз- курс АТГ составил 260 дней, а нерецидивировавших – 134 дня. Риск рецидива не зависел от пола и возраста пациентов, а также от тяжести аплазии. Прогноз пациентов, рецидивировавших после успешной иммуносупрессии не так уж и плох: вероятность 10-летней выживаемости после рецидива АА по данным вышепротитированного исследования 67,1% и повторная ремиссия достигнута у 39 из 74 рецидивировавших (52,7%).

Если повторные курсы иммуносупрессивной терапии способны вернуть рецидивировавших больных в состояние гематологической ремиссии, то вторая группа поздних гематологических аномалий – миелодиспластические синдромы и острые лейкозы коренным образом влияет на прогноз больных. Случаи эволюции АА в ОМЛ и МДС были известны и до внедрения терапии АТГ, однако их частота была очень низка – не более 5%.

По данным же Базельской группы риск развития поздних клональных аномалий составляет 42% через 15 лет после успешной иммуносупрессии: у 26% отмечается развитие миелодиспластических синдромов и острых миелоидных лейкозов и у 25% - синдрома пароксизмальной ночной гемоглобинурии (у 9% регистрируется развитие обеих аномалий). Выживаемость среди пациентов, у которых развились поздние клональные аномалии была 36% против 81% среди больных со стабильным течением заболевания. Примерно в 4 раза ниже (10%) риск развития МДС/ОМЛ был обнаружен Raquette с соавт в группе из 77 взрослых больных, ответивших на АТГ. В проведенном Европейским регистром анализе репрезентативной популяции из 860 больных АА, получивших иммуносупрессивную терапию, риск развития МДС составил 9,6%, а ОМЛ - 6,6% через 10 лет от проведения курса АТГ. Интересно, что риск развития МДС/ОМЛ был значительно выше среди спленэктомированных пациентов, у больных старшего возраста, у больных, получавших андрогены, а также при проведении более чем одного курса АТГ. Таким образом, качество восстановления гемопоэза после успешной терапии АТГ отличается от такового после аллогенной ТКМ. Интересно, что, вопреки расхожему мнению, функциональные характеристики костного мозга после успешной терапии АТГ и ТКМ идентичны - в обоих случаях обнаруживается глубокий дефицит как ранних, так и коммитированных предшественников гемопоэза.

### **Циклоспорин А**

Циклоспорин А, выделенный в 1972 году швейцарским иммунологом Борелем, является одним из метаболитов микроскопического грибка *Tolipocladium inflatum* и представляет собой циклический полипептид, состоящий из 11 аминокислот. Циклоспорин А обуславливает селективную супрессию клеточно-опосредованных иммунных реакций путем ингибции IL-2 – зависимой активации Т-клеток. Основные этапы механизма действия циклоспорина А охарактеризованы довольно точно: проникая внутрь клетки, CsA связывается со своим клеточным рецептором циклофиллином, образуя гетеродимерный комплекс, ингибирующий функцию кальциневрина – серин-треониновой фосфатазы, которая активирует ряд ядерных активаторов транскрипции генов кодирующих IL-2,  $\gamma$ -IFN и TNF- $\alpha$ . Таким образом, ингибируя функцию кальциневрина, CsA подавляет секрецию (пара- и аутокринную) вышеуказанных цитокинов и, соответственно, IL2-зависимую активацию Т-лимфоцитов – эффекторов иммунного ответа и эффекты опосредуемые  $\gamma$ -IFN и TNF- $\alpha$ . Иммуносупрессивное действие CsA высокоселективно – он не обладает цитотоксическим действием, не ингибирует функции НК-клеток и не нарушает продукции Т-лимфоцитами гемопоэтических ростовых факторов. Внедренный в клиническую практику в конце 70-х - начале 80-х годов в качестве иммуносупрессивного агента,



активного в режимах профилактики отторжения аллогенных трансплантатов солидных органов и костного мозга, циклоспорин А очень скоро привлек к себе внимание в качестве препарата с высоким лечебным потенциалом в отношении аутоиммунных заболеваний. Естественно, что высокоселективный иммуносупрессивный препарат, к тому же лишенный миелотоксического действия, является в высшей степени привлекательным для использования именно при апластических анемиях. Первые сообщения об эффективности CsA у пациентов с АА, рефрактерных к лечению АТГ появились в 1984 году и в дальнейшем на небольших группах больных было показано, что у нелеченых больных эффективность CsA приближается к таковой АТГ, а у рефрактерных к лечению АТГ процент успеха терапии циклоспорином А составлял 30-50%. В 1986-1989 годах было проведено проспективное рандомизированное исследование в на 116 больных тяжёлой или сверхтяжёлой АА в 37 центрах Франции, Бельгии и Швейцарии. По условиям протокола, при отсутствии через 3 месяца гематологического ответа больные из группы циклоспорина А получали АТГ и наоборот. Шестьдесят пациентов вошли в группу получивших в качестве терапии первой линии CsA и 56-АТГ. Через три месяца гематологический ответ был достигнут у 11,6% больных, получавших циклоспорин А и 16%, получавших АТГ. Через 12 месяцев гематологическая ремиссия была зафиксирована у 30% больных. Таким образом, было показано, что эффективность циклоспорина сравнима с таковой АТГ, равно как похожей была и кинетика гематологического ответа. В полном соответствии с ожиданиями, тяжесть аплазии являлась самым значимым фактором прогноза при лечении CsA – больные со сверхтяжёлой аплазией имели вдвое худшие шансы на гематологический ответ.

Нами было проведено достаточно крупное исследование эффективности монотерапии CsA, в котором было показано влияние тяжести АА на результаты терапии (рисунок...).

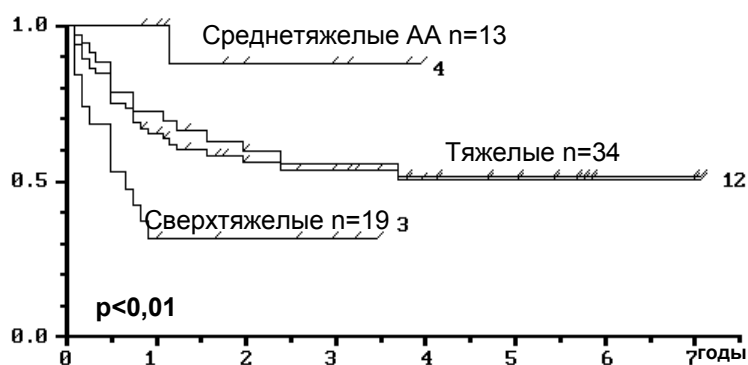


Рисунок 4. Выживаемость пациентов с АА, леченых монотерапией циклоспорином в зависимости от тяжести аплазии. Maschan et al Br J Haematol 1999

Во всех исследованиях больших групп больных АА, леченых CsA, у части пациентов достигших гематологической ремиссии развивается феномен т.н. «циклоспориновой зависимости» – состояния, при котором при отмене или снижении дозы циклоспорина развивается рецидив панцитопении и для поддержания состояния ремиссии необходимо длительное, иногда многолетнее продолжение лечения CsA.

В недавнем исследовании было показано, что риск рецидива аплазии был существенно ниже при очень медленном снижении циклоспорина А (0,3 мг/кг в месяц). Правда, это исследование проведено у детей, получавших комбинированную ИСТ. (*Saracco Pet al. Cyclosporine response and cyclosporine dependence in children with acquired aplastic anaemia treated with immunosuppression: a multicentre retrospective study with long term observation follow up. Haematologica. 2007; В печати.*)

### Комбинированная терапия циклоспорином А и АТГ.

Поскольку механизмы терапевтического действия циклоспорина А и АТГ при апластических анемиях разнятся, логично было испробовать лечение больных АА комбинацией CsA с АТГ. Первое такое исследование было проведено в Германии, второе на несколько лет позднее - в США. В немецком рандомизированном исследовании, сравнивавшем результаты комбинированной терапии АТГ+CsA с терапией АТГ продемонстрированы значимо лучшая выживаемость и уровень гематологических ремиссий в группе комбинированной иммуносупрессии: через 6 месяцев терапии ответило 70% против 46% в группе АТГ. Принципиально важной находкой явилось то, что эта разница была обусловлена более высокой частотой ремиссий в группе больных с тяжёлой и сверхтяжёлой АА – 65% в группе АТГ+CsA против 31% в группе АТГ. Интересно, что преимущество в бессобытийной (failure free), но не общей, выживаемости у реципиентов комбинированной иммуносупрессии сохранялось и через 10 лет катamnестического наблюдения.

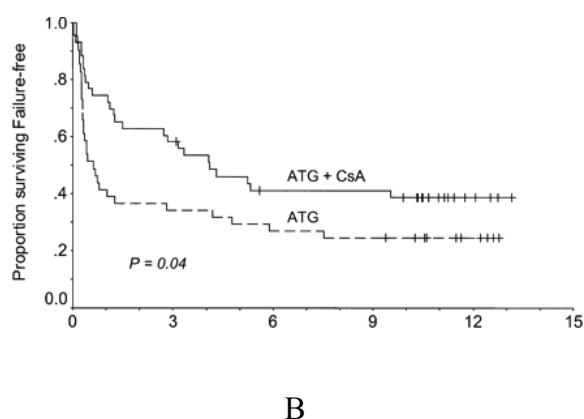
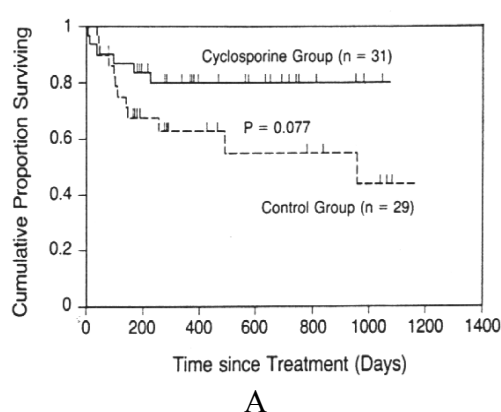


Рисунок 5. Выживаемость больных АА, леченых АТГ или комбинацией АТГ+CsA а)

Frickhofen N et al. N Engl J Med 1991;324:1297-1304, в) Blood. 2003 Feb 15;101(4):1236-42.

Результаты этого исследования были подтверждены исследованием Rosenfeld с соавт, которые добились ремиссии у 78% больных с тяжёлой и сверхтяжёлой АА, получавших лечение 4-х дневным курсом АТГ (АТГАМ) и циклоспорином А в течение 6 месяцев. Интересно, что авторы отметили высокий уровень рецидивов аплазии (риск 36% через 2 года после терапии АТГ), однако большинство из рецидивировавших вновь ответили на возобновление иммуносупрессии АТГ или циклоспорином А. Это прямо свидетельствует в пользу необходимости длительного приема CsA.

Таким образом, доказано, что у больных с тяжелыми АА комбинированная иммуносупрессия приносит лучшие результаты по сравнению с монотерапией АТГ или циклоспорином А.

### **Комбинированная иммуносупрессия в сочетании с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором.**

Инфекционные осложнения, особенно инвазивные микозы, являются главной причиной ранней летальности пациентов с АА, а главным фактором риска развития фатальных инфекций является тяжелая гранулоцитопения. Соответственно, успешная стимуляция гранулоцитопоеза и повышение уровня гранулоцитов способны резко снизить риск ранней смерти и дать пациентам возможность дожить до трехлинейного восстановления гемопоэза. Реализация этой идеи стала возможной с появлением в клинической практике фармакологических препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF).

Первое относительно крупное исследование эффективности G-CSF было опубликовано в Японии в 1991 году. Из 20 детей с тяжелыми и среднетяжелыми АА, получавших G-CSF в дозе 400 мкг/м<sup>2</sup> у 12 отмечено повышение гранулоцитов. Та же группа провела исследование эффективности G-CSF в повышающихся дозах (400-2000 мкг/м<sup>2</sup>) у 10 детей с АА и нейтрофилами ниже 100/мкл. У 6 из 10 пациентов был зарегистрирован подъём гранулоцитов, сопровождавшийся расширением миелоидного ростка в костном мозге. Важно отметить, что из 5 больных с полным отсутствием циркулирующих нейтрофилов появление гранулоцитов отмечено только у 1-го независимо от дозы G-CSF, в то время как повышение произошло у всех пятерых больных с сохранением хотя бы минимального количества гранулоцитов. Ответ достигался в срок до 4-х недель, причём у двух больных – в течение первых 2-х недель терапии G-CSF. Переносимость препарата была превосходной даже при самых высоких дозировках. Следует отметить, что трёхлинейных ответов на фоне терапии G-CSF, которые были бы

несомненно связаны с ним самим, а не с предшествующей иммуносупрессией отмечено не было.

Первое исследование эффективности комбинированной иммуносупрессии АТГ («Lymphoglobuline» 75 мг/кг на курс) +CsA (в течение 180 дней) в сочетании с 90-дневным курсом G-CSF 5 мкг/кг было проведено в Европе в 1991–1993 годах. Вероятность достижения трансфузионной независимости через 18 месяцев составила 97%. Тем не менее, из 40 пациентов с тяжёлыми и сверхтяжёлыми АА (медиана гранулоцитов 190/мкл) от сепсиса в первые 100 дней умерло 3 пациента (все из группы свехтяжёлых АА), 4 оказались рефрактерными к проводимому лечению и 33 (82%) пациента достигли гематологической ремиссии. Интересно, что при продолжении этого исследования и продлении катамнеза по данному исследованию на несколько лет, было показано, что только у 35% пациентов оказались успешными. попытки отмены циклоспорина А.

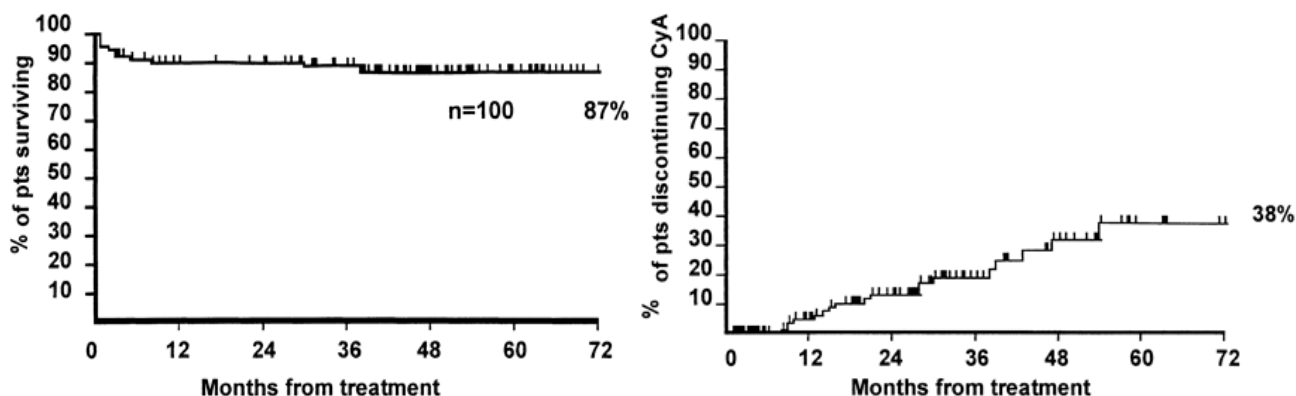


Рисунок 6. Вероятность выживаемости (слева) и отмены циклоспорина А у пациентов, получивших терапию АТГ+CsA+G-CSF

В дальнейшем было проведено ещё несколько исследований вышеуказанной комбинации с похожими результатами. Интересно, что в исследовании эффективности комбинированной иммуносупрессии в сочетании с G-CSF у детей, проведенном в Австрии и Германии было показано, что прогноз пациентов со сверхтяжелой формой АА оказался даже лучше, чем у детей с тяжелыми формами. Протокол лечения был аналогичен применявшейся в предыдущем исследовании. Уровень гематологических ремиссий составил 61% через 112 дней от начала терапии, 74% через 12 месяцев и 80% - через 18 месяцев. Уровень полных ремиссий составил соответственно 13%, 39% и 55%. В группе больных со сверхтяжёлыми АА через 18 месяцев от начала терапии 90% пациентов достигли ремиссии, причём у 65% больных показатели соответствовали критериям полного ответа (рисунок 6)

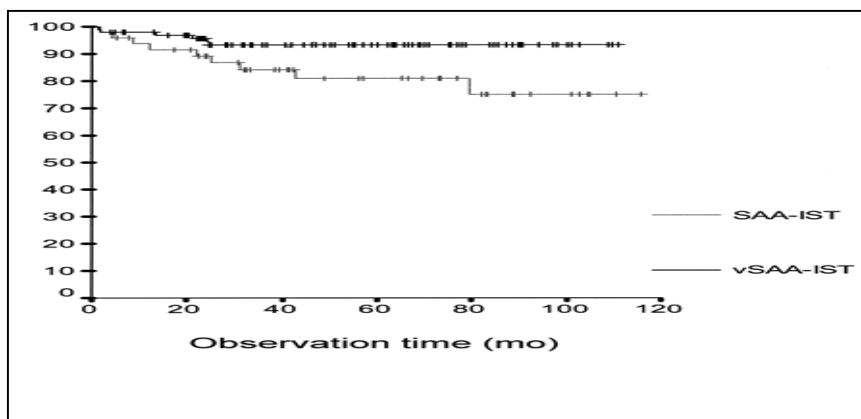


Рисунок 6. Выживаемость детей с приобретенными АА в зависимости от тяжести заболевания. Серая линия – тяжелые АА, черная линия – сверхтяжелые АА. Monika Führer et al, Blood 2005

Недавно в Европе завершено рандомизированное исследование двух дозировок G-CSF (ленограстим 2,5 мкг/кг vs 10 мкг/кг в сутки) у пациентов с АА, которое не выявило преимуществ в выживаемости и скорости гранулоцитарного ответа. В другом Европейском исследовании в котором сравнивались два дозовых режима G-CSF (5 мкг/кг vs 10 мкг/кг в сутки) было показано, что недостижение по влиянием G-CSF уровня гранулоцитов > 5000/мкл является фактором плохого прогноза в отношении вероятности гематологического ответа и выживаемости

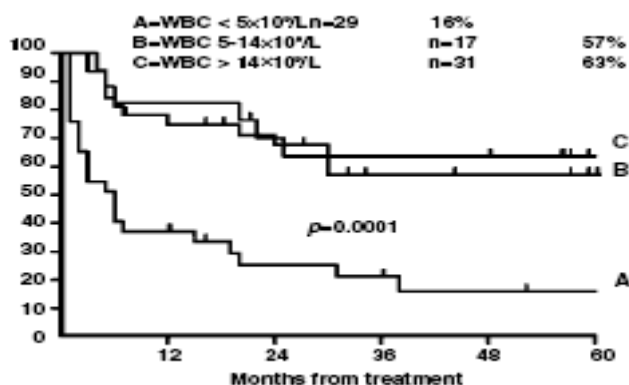


Рисунок 7. Вероятность бессобытийной выживаемости в зависимости от достижения уровня гранулоцитов выше 5000/мкл Locasciulli A, Haematologica. 2004;89:1054–1061

Несмотря на впечатляющие результаты интенсивной ИСТ в сочетании с G-CSF, в отношении необходимости его применения при АА консенсуса не достигнуто. Это связано с двумя группами причин. Во-первых, в первых двух рандомизированных исследованиях влияния G-CSF на результаты терапии не выявлено, хотя в последнем опубликованном исследовании комбинированной ИСТ±G-CSF в Японии был показано, что у больных,

получавших G-CSF не только была выше вероятность достижения гематологического ответа, но и ниже риск рецидива АА

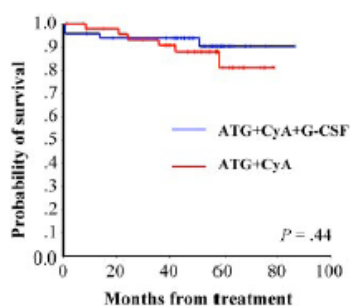


Figure 1. Actuarial survival of adult patients with SAA in the G-CSF- and G-CSF+ groups.

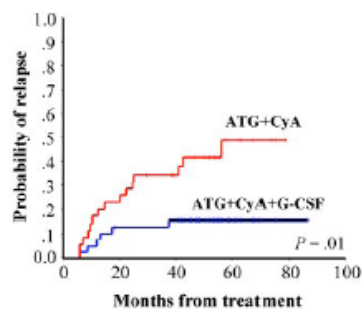


Figure 2. Cumulative incidence of relapse in adult patients with SAA in the G-CSF- and G-CSF+ groups.

Рисунок 8. Вероятность достижения общей и безрецидивной выживаемости больных АА, получивших ИСТ±G-CSF Teramura et al. Blood. 2007;110;1756–1761)

Во-вторых, ретроспективными исследованиями показано, что применение G-CSF у пациентов с АА может увеличивать риск развития острых миелоидных лейкозов и миелодиспластических синдромов. На это указывают целый ряд сообщений, главным образом японских авторов, располагающих наибольшим опытом длительного применения высоких доз G-CSF у больных с АА. При анализе катамнестических данных 119 детей получивших иммуносупрессивную терапию АТГ и /или циклоспорином с или без G-CSF риск развития МДС/ОМЛ оценивался в  $22 \pm 12\%$ , причём все 11 случаев клональной эволюции зарегистрированы в группе из 50 больных, которые получали CsA и G-CSF вместе (риск  $47 \pm 17\%$  через 6 лет). Ни одного случая МДС не было зафиксировано в остальных группах (монотерапия CsA, АТГ→G-CSF). Все пациенты получали G-CSF длительно (медиана 25 месяцев) и в высокой суммарной дозе (2400 – 10 000 мкг/кг). Большинство МДС развивались в сроки до 36 месяцев после установления диагноза, что значительно контрастирует с динамикой клональной эволюции у пациентов, получавших монотерапию АТГ.

Менее тревожная статистика приводится в вышепротитированном австро-немецком исследовании, в котором из 78 больных ответивших на иммуносупрессию МДС развился у 4-х, причём у двоих кариотипические аномалии (5q-; -7) , были обнаружены ещё до начала иммуносупрессивного лечения. Интересно заметить, что подавляющее большинство МДС, развивающихся после или на фоне лечения G-CSF, ассоциированы именно с моносомией 7. Это в равной степени справедливо как для больных с АА, так и для больных с синдромом Костмана, у 80% которых лечение G-CSF нормализует количество гранулоцитов, но более чем у 10% приводит к развитию МДС. Необходимо упомянуть и то, что сама по себе моносомия 7 не является признаком развития МДС, поскольку описаны

случаи появления и исчезновения клеток, несущих данную аберрацию, без сопутствующего появления морфологических признаков миелодисплазии. Наконец, оба проспективных исследования комбинированной ИСТ±G-CSF не выявили повышенного риска поздних клональных аномалий. Заканчивая характеристику роли G-CSF в лечении АА, следует отметить, что в дозах 5-10 мкг/кг препарат способен вызывать подъём гранулоцитов у большинства больных АА, позволяет снизить раннюю инфекционную летальность. В то же время риск развития вторичных ОМЛ у пациентов, отвечающих на G-CSF и восстанавливающих трехлинейный гемопоэз невысок.

## **Цель протокола**

Оценить эффективность комбинированной иммуносупрессивной терапии антитимоцитарным глобулином и циклоспорином А в сочетании с пегилированным филграстимом (Неуластим) в лечении приобретенных тяжелых и сверхтяжелых апластических анемий у детей

## **Обоснование использования пегфилграстима.**

Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) позволяет повысить уровень гранулоцитов выше порога «безопасности» в 500/мкл у 80% пациентов с тяжелыми и сверхтяжелыми апластическими анемиями. У половины пациентов это повышение достигается в течение первых двух недель от начала введения препарата. Нормализация числа гранулоцитов позволяет минимизировать риск жизнеугрожающих инфекций – основной причины смертности и главной «статьи расходов» на лечение больных с АА. Вследствие короткого периода жизни стандартные препараты G-CSF (филграстим и ленограстим) необходимо применять ежедневно, что болезненно для пациента и неудобно для медицинского персонала и семьи больного. Применение пегилированного филграстима, позволяющего увеличить интервал между введениями до 10-14 дней, безусловно оправдано при условии доказательства его равной эффективности и безопасности. Учитывая низкое число гранулоцитов у пациентов с апластическими анемиями, что потенциально может ограничивать клиренс препарата, обусловленный нейтрофилами, фармакокинетика пегфилграстима у этой категории больных может существенно отличаться от фармакокинетики у пациентов с постхимиотерапевтической нейтропенией.

С 2005 года опубликовано несколько работ по использованию пегфилграстима у детей с солидными опухолями. Показано, что переносимость и побочные эффекты пегфилграстима не отличались от таковых при использовании стандартного филграстима.

## **Задачи протокола**

Изучить динамику числа гранулоцитов под влиянием Неуластима у детей с приобретенными АА

Изучить фармакокинетику филграстима при применении Неуластима у детей с приобретенными АА

## **Критерии включения в исследование**

В исследование включаются дети от 0 до 17 лет с приобретенной тяжелой и сверхтяжелой АА, не имеющие HLA-идентичного семейного донора или не подлежащие трансплантации костного мозга по другим причинам. В исследование включаются пациенты как с вновь диагностированными АА, так и с рецидивами заболевания.





### **Критерии исключения из исследования**

Не подлежат включению в исследование больные, родители которых не дали информированного согласия, а также:

- Пациенты с гиперчувствительностью к G-CSF
- Пациенты с прогнозом выживаемости менее 7 дней (например, септический шок с полиорганной недостаточностью, внутричерепное кровоизлияние с глубоким поражением корковых функций)
- Пациенты с уровнем гранулоцитов выше 500/мкл
- Конституциональными формами костномозговой недостаточности
- Парциальными «центральными» цитопениями
- пациенты с гипопластическими миелодиспластическими синдромами, определяемыми как трехростковая цитопения, гипоклеточный костный мозг с признаками дисплазии во всех трех линиях с характерными аномалии кариотипа или без таковых.

### **Критерии гематологического ответа на терапию**

**Все виды гематологического ответа предполагают независимость от трансфузий, за исключением переливаний, необходимых для обеспечения инвазивных вмешательств (операции, катетеризации).**

**Полный гематологический ответ: достижение всех трех показателей:**

Нв > 110 г/л, гранулоциты >1500/мкл и тромбоциты >150000/мкл.

**Частичный гематологический ответ:**

Нв > 90-110 г/л, гранулоциты на 500/мкл выше, чем на момент диагностики и тромбоциты >30000/мкл.

**Минимальный гематологический ответ:**

Нв > 80- 90 г/л, гранулоциты > 500/мкл, чем на момент диагностики и тромбоциты >10000/мкл.

## **Протокольные исследования**

### **1 HLA-типирование пациента, сиблингов и родителей**

### **2. Исследование костного мозга:**

Миелограмма из 3-х анатомически различных точек

Трепанобиопсия

Цитогенетическое исследование (при необходимости)

Иммунофенотипирование при наличии показаний

### **3. Исследование периферической крови:**

Автоматизированный анализ крови + ретикулоциты + подсчет

лейкоцитарной формулы на мазках

Свободный Нв плазмы, гаптоглобин, обмен железа (при подозрении на ПНГ)

Проба Хэма, сахарозная проба (при подозрении на ПНГ)

Иммунофенотипирование лейкоцитов периферической крови (при подозрении на ПНГ или острый лейкоз):

Биохимический анализ крови: билирубин, ЛДГ, АлАТ,

АсАТ, гамма-ГТП, ЩФ, креатинин, мочевины,

### **4. Цитогенетическое исследование:**

Проба на чувствительность лимфоцитов периферической крови к диэпоксидантам.

### **5. Вирусологическое исследование. Серология HBV, HCV, ВИЧ, CMV, EBV (по показаниям)**

### **5. R-графия или КТ грудной клетки**

### **6. УЗИ брюшной полости**

### **7. ЭКГ, Эхо-КГ**

## Лабораторный мониторинг

1. Гемограмма с ручным подсчетом лейкоцитарной формулы: первые две недели применения Неуластима - ежедневно, далее по усмотрению лечащего врача.
2. Биохимический анализ крови: первые две недели приема циклоспорина А - 2 раза в неделю, далее - по усмотрению лечащего врача.
3. Мониторинг уровня циклоспорина А (см. ниже)
4. Исследование фармакокинетики неуластима

Образцы сыворотки (цельной крови) для исследования фармакокинетики неуластима забираются:

- Первая серия: после второго введения (день 19 от начала АТГ)) ежедневно - всего 21 образец
- Вторая серия: после достижения уровня гранулоцитов выше 500/мкл: ежедневно после введения в течение 14 дней

## Описание протокола

**1. Антитимоцитарный глобулин** (лошадиный) фирмы Pfizer (ATGAM) вводится в курсовой дозе 160 мг/кг, разделенной на 4 дозы по 40 мг/кг 4 дня подряд (1-4 дни протокола).

У больных с рецидивом АА может использоваться кроличий АТГ (Тимоглобулин, Genzyme) в суточной дозе 3,75 мг/кг в течение 5 дней (суммарная доза 18,5 мг/кг).

**2. Циклоспорин А (Неорал<sup>®</sup>, Новартис)** назначается в суточной дозе 4-5 мг/кг внутрь на 2 приема. Доза циклоспорина подбирается таким образом, чтобы его концентрация в цельной крови, измеренная до приема (trough level) составляла 150-300 нг/мл (иммуноферментный метод или радиоиммунный метод с моноклональными антителами). Уровень циклоспорина А мониторируется в первый раз через 4-7 дней после начала его приема. Модификация дозы в первые две недели проводится, только если уровень CsA существенно превышает границу «терапевтического» интервала. При недостижении минимального терапевтического уровня, коррекция дозировки CsA проводится только при концентрациях < 50 нг/мл, учитывая феномен постепенного улучшения всасывания препарата,. Если концентрация остается низкой по истечении двух недель, увеличение дозировки проводится, учитывая линейную зависимость между дозой и концентрацией (т.е. например, при желаемом повышении концентрации в 2 раза, необходимо удвоить дозу). Если Циклоспорин А назначается совместно с препаратами ингибирующими его инактивацию (итраконазол, вориконазол, позаконазол, эритромицин и т.д.) следует ожидать более быстрого установления терапевтических концентрации и большей вероятности их превышения. Мониторинг у таких больных должен проводиться чаще.

Минимальный курс лечения полной дозой Циклоспорина А - 18 месяцев, при условии того, что от достижения плато гематологического ответа (полного или парциального) прошло не менее 12

месяцев. Снижение дозы Циклоспорина А проводится каждые 2 недели по 5% от дозы на момент начала снижения. Т.е. минимальная длительность снижения циклоспорина А составляет 40 недель, а минимальная длительность полного курса лечения – 118 недель. При ухудшении гематологических показателей доза циклоспорина вновь повышается до достижения вышеуказанного терапевтического уровня препарата.

#### Коррекция дозы циклоспорина А:

При повышении в б/х анализе показателей креатинина и/или мочевины выше возрастной нормы, прием циклоспорина прекращается и возобновляется после нормализации показателей в дозе 50% от дозы, предшествовавшей отмене. В дальнейшем при нормальной «почечной» толерантности доза препарата может быть осторожно повышена. **При невозможности добиться «терапевтической» концентрации при дозах циклоспорина А более 8 мг/кг в сутки необходимо провести исследование концентрации циклоспорина А через 2 часа после приема ( $C_2$ ), что позволяет дифференцировать сниженное всасывание от повышенного клиренса. При низкой  $C_2$  (<500 нг/мл) доза циклоспорина повышается. При нормальной  $C_2$  (600-800 нг/мл) и низкой  $C_{trough}$  суточная доза циклоспорина разбивается на 3 приема.**

При назначении ингибиторов цитохрома р450 модификация дозы осуществляется следующим образом:

Концентрация [CsA]	Креатинин	доза [CsA]
100-200 нг/мл	N + не более, чем в два раза выше базального	Не меняется
100-200 нг/мл	N + два и более больше базального или предшествующие эпизоды отмены Cs из-за почечной токсичности	Уменьшается вдвое
200-300 нг/мл	N	Уменьшается вдвое

**3. Метилпреднизолон** в дозе 1 мг/кг сут внутривенно, разделенной на 3-4 приема назначается с 1 до 14 дня от начала введения АТГ. После окончания курса АТГ метилпреднизолон может даваться внутрь в той же дозе. Первое введение метилпреднизолон начинается за 1 час до начала инфузии АТГ. При наличии у пациента на момент начала терапии доказанного или вероятного инвазивного микоза доза метилпреднизолон снижается до 0.5 мг/кг. В случае развития признаков сывороточной болезни доза метилпреднизолон может повышаться до 2 мг/кг в сутки, но в целом, подобное повышение не рекомендуется, поскольку сывороточная болезнь чаще всего является самоограниченным синдромом, длящимся в среднем 4-7 дней.

#### **4. Неуластим**

Лечение Неуластимом начинается на следующий день после окончания курса АТГ. Доза Неуластима - 100 мкг/кг подкожно 1 раз в 3 недели. При недостижении повышения гранулоцитов выше 500/мкл в течение 2 месяцев (т.е. после минимум 4 введения) Неуластим отменяется. Если

на любом этапе лечения достигается уровень гранулоцитов  $> 5\ 000/\text{мкл}$  Неуластим начинает вводиться в ритме, позволяющем поддерживать нейтрофилы на уровне не ниже  $1000/\text{мкл}$ . При достижении субоптимального гранулоцитарного ответа любого качества (более  $500/\text{мкл}$ , но менее  $1500/\text{мкл}$ ) Неуластим продолжает вводиться в режиме, необходимом для поддержания гранулоцитов не менее  $500/\text{мл}$ . При документации трехлинейного ответа (т.е. повышения числа тромбоцитов выше  $20\ 000$  и гемоглобина выше  $80\ \text{г/л}$ ) Неуластим отменяется.

**Пациенты, которые по каким либо причинам, не включенные в протокол исследования неуластима, получают аналогичную иммуносупрессивную терапию согласно протоколу, но не входят в группу оценки эффективности неуластима.**

### **Сопроводительная терапия**

1. Все пациенты, получающие лечение АТГ изолируются в отдельные палаты и получают низкобактериальную пищу. При выходе за пределы палаты – обязательно ношение респиратора с НЕРА-фильтром (до подъема гранулоцитов выше  $500/\text{мкл}$ ).

2. Все пациенты АА получают профилактику инвазивных микозов по выбору лечащего врача. Антибактериальная «деконтаминация» не проводится.

Суточные дозы антимикотиков: вориконазол  $14\ \text{мг/кг}$  (в 2 приема), позаконазол  $200\ \text{мг}$  х 4 раза для детей старше 8 лет, флюконазол  $5\text{--}8\ \text{мг/кг}$  (в 1 прием), итраконазол в суспензии  $5\ \text{мг/кг}$  (в 2 приема)

Профилактика антимикотиками прекращается после достижения гранулоцитов выше  $500/\text{мкл}$ , но не ранее 2-х недель после окончания лечения глюкокортикоидами.

3. Туалет полости рта:

чистка зубов мягкими зубными щетками.

полоскание антисептиками 4-5 раз в день

запрещается пользование жесткими зубными щетками, зубочистками,

зубными нитками

запрещается использование пластмассовых ложек и вилок (опасность травматизации слизистых острыми краями)

4. Трансфузионная терапия

тромбовзвесь переливается в каждый из дней введения АТГ незадолго до начала инфузии последнего.

облученная в дозе 25 Гй и фильтрованная эритроцитная масса переливается для поддержания Нв на уровне  $> 80\ \text{г/л}$

облученная в дозе 25 Гй тромбоцитная масса и фильтрованная переливается для поддержания тромбоцитов на уровне  $> 10\ 000/\text{мкл}$ , при угрожающем геморрагическом

синдроме – независимо от числа тромбоцитов.

#### 5. Лечение лихорадки неясной этиологии и документированных инфекций.

**Интерпретация причины лихорадки у пациентов с АА, получающих терапию АТГ затруднена вследствие идентичности симптомов реакции на АТГ и сывороточной болезни и «инфекционной» лихорадки. Кроме того, на фоне терапии глюкокортикоидами может наблюдаться повышение уровня гранулоцитов более 500/мкл. Поэтому, до отмены глюкокортикоидов все больные с тяжелой и сверхтяжелой АА должны считаться «в агранулоцитозе» независимо от числа гранулоцитов в гемограмме!!!**

При развитии лихорадки неясной этиологии у пациентов, у которых уровень гранулоцитов не достиг 1000/мкл, немедленно назначается стандартная антибактериальная терапия, базирующаяся на  $\beta$ -лактамом антибиотике с выраженной «антисинегнойной» активностью: цефепим, сульперазон или пиперациллин/тазобактам. При «неосложненной» ЛНЭ (хорошее самочувствие, нормотензия, отсутствие органной дисфункции, отсутствие тахикардии при снижении температуры или несоответствие температуры и ЧСС) возможна монотерапия  $\beta$ -лактамом. При наличии ознобов, плохого самочувствия, выраженной тахикардии, любой органной дисфункции или гипотензии назначается комбинированная антибактериальная терапия либо двумя ( $\beta$ -лактам + амикацин) либо тремя препаратами ( $\beta$ -лактам + амикацин + ванкомицин). При наличии любой респираторной симптоматики – немедленно КТ грудной клетки и при наличии любых очаговых изменений – назначение лечения, направленного на *Aspergillus*. При идентификации возбудителя – коррекция а/б терапии в зависимости от чувствительности. При отсутствии бактериологических или клинических опорных моментов коррекция антибактериальной терапии проводится по общим правилам (смена цефалоспоринов на карбапенем, эмпирическое назначение антимикотиков, назначение/отмена ванкомицина и аминогликозидов) в зависимости от достижения афебрилитета, клинического состояния и лабораторных данных. Любая лихорадка без тенденции к разрешению длительностью более 5 дней является показанием к КТ легких.

#### 4. Сопроводительные мероприятия при лечении АТГ.

Всем больным перед началом лечения АТГ имплантируется центральный венозный катетер.

Учитывая способность АТГ значительно снижать уровень тромбоцитов и вызывать другие осложнения способствующие возникновению геморрагии - высокую лихорадку и повышение АД, необходима трансфузия адекватной дозы тромбоконцентрата в каждый из дней введения АТГ. Желательно достижение уровня тромбоцитов не ниже 30 000/мкл. За 1 час перед первой дозой АТГ, закономерно вызывающей потрясающие ознобы, гипертермию, рвоту, гипертензию, головную боль и кожную сыпь вводится в/в 0,15 мг/кг дексаметазона, антигистаминные средства и 15 мг/кг парацетамола внутрь. При появлении вышеописанных симптомов **введение АТГ приостанавливается до купирования симптомов**, вводится еще одна такая же доза дексаметазона

и парацетамола. Время инфузии первой дозы АТГ составляет 8-10 часов. Вторая доза АТГ также может вызывать вышеуказанные симптомы, хотя и менее выраженные, в то время как последующие дозы АТГ, как правило, таких симптомов не вызывают и могут быть введены за 4-6 часов, а сопроводительные мероприятия проводятся по усмотрению лечащего врача.

При введении АТГ, хотя и очень редко, возможно развитие анафилаксии, поэтому в непосредственной доступности должен находиться набор для купирования анафилактического шока:

**раствор адреналина 1 мл 0,1% р-ра в 400 мл физ. р-ра**

**желатиноль или гидроксиэтилкрахмал 500 мл**

**гидрокортизон**

**тавегил**

**источник кислорода**

При возникновении анафилактического шока немедленно начинается введение приготовленного раствора адреналина 0,1 мкг/кг мин (2-6 мл/мин), гидроксиэтилкрахмала 20 мл/кг за 30 минут,

Вводится гидрокортизон 10 мг/кг, тавегил в возрастной дозировке, дается кислород через маску. Вызывается реаниматолог.

При развитии бронхоспазма, генерализованной уртикарной сыпи или отека Квинке введение АТГ останавливается; вводится гидрокортизон 10 мг/кг и тавегил в возрастной дозировке. При бронхоспазме дополнительно дается ингаляция бета-стимуляторов. При отсутствии эффекта – начинается введение адреналина в стартовой дозе 0,1 мкг/кг мин). На 7-15 дни от начала лечения АТГ возможно развитие сывороточной болезни, проявляющейся в виде лихорадки, пятнисто-папулезной сыпи, артралгий, миалгий, иногда артритов, гематурии, протеинурии. В зависимости от тяжести, лечение включает в себя повышение дозы глюкокортикоидов, адекватное обезболивание, парацетамол в качестве жаропонижающего.

## **5. Сопроводительные мероприятия при лечении CsA**

При лечении циклоспорином возможно развитие следующих осложнений: артериальная гипертензия, судороги, нарушение функции почек, гипертрихоз, гиперплазия десен, повышение веса, артралгий. При возникновении инфекционных осложнений, предпочтение должно отдаваться препаратам, не влияющим на функцию почек. При необходимости назначения нефротоксичных препаратов (аминогликозиды, ванкомицин, амфотерицин В) необходим тщательный - не менее трех раз в неделю - мониторинг функции почек, с коррекцией соответствующим образом дозы нефротоксичных препаратов. При появлении нефротоксичности (повышение креатинина или мочевины) циклоспорин отменяется до нормализации функции



почек. После нормализации функции почек Циклоспорин возобновляется в половинной дозе. Контроль артериальной гипертензии осуществляется с помощью блокаторов кальциевых каналов или ингибиторов АПФ, при необходимости острой коррекции гипертензии - нифедипин 10 мг под язык.

#### 5.1 Коррекция дозы Циклоспорина А.

Показания к окончательной отмене Циклоспорин А

- Синдром Мошковица/ГУС

Показания к временной отмене и коррекции дозы:

- Почечная недостаточность:

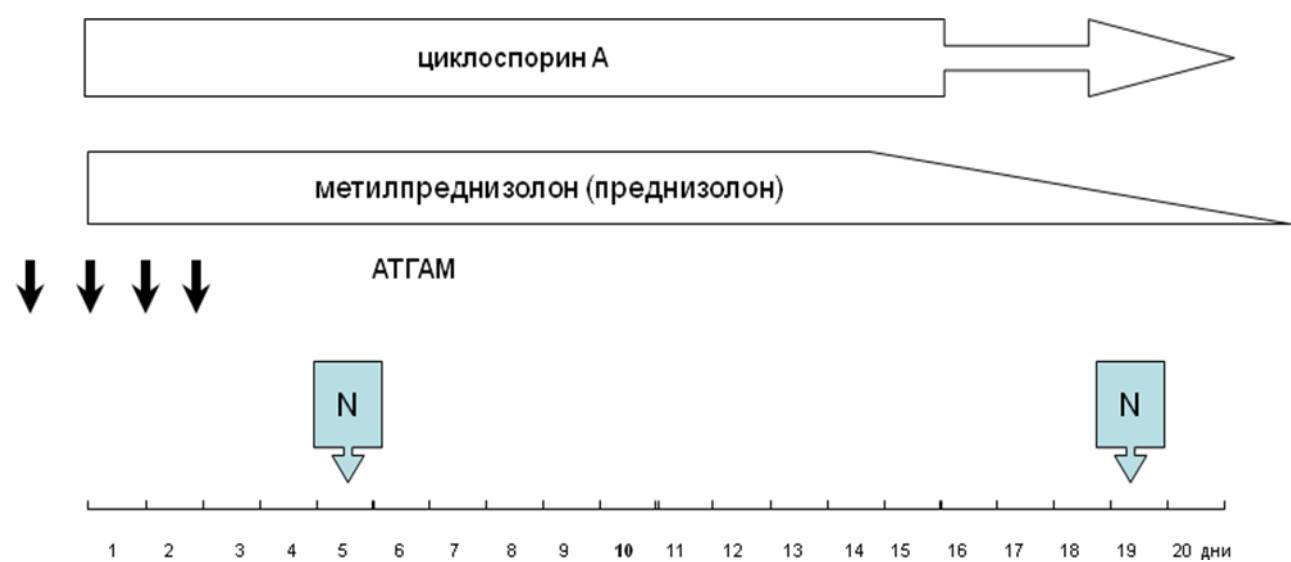
При повышении креатинина выше возрастной нормы - Циклоспорин А отменяется и возобновляется в 50% дозе после нормализации. При хорошей "почечной" переносимости этой дозы и недостижении на ней порога терапевтической концентрации, можно перейти к постепенному повышению дозы.

- Тремор зачастую является предвестником ЦНС-токсичности циклоспорина А, поэтому при его появлении необходимо тщательное наблюдение за пациентом и при прогрессировании – временная отмена циклоспорина А.
- При превышении уровня циклоспорина А выше 300 нг/мл, доза препарата снижается, учитывая линейную зависимость концентраций от дозы. При возникновении серьезных осложнений со стороны ЦНС - судорог, нарушений зрения, ишемического нарушения мозгового кровообращения Циклоспорин А отменяется и возобновляется после купирования симптомов и нормализации МРТ-картины в 30-50% дозе. При хорошей толерантности и субтерапевтическом уровне доза может быть увеличена, начиная с 10-14 дня после возобновления препарата. Другие осложнения: гиперплазия десен, задержка жидкости, гипертрихоз – не являются показаниями к коррекции доз.

#### Вторая линия терапии

При невыполнении критериев хотя бы парциального ответа через 120 дней от начала первого курса проводится повторный курс лечения АТГ. Параллельно посылается запрос в регистр Stefan Morsh Stiftung для предварительного поиска совместимого неродственного донора. В качестве второго АТГ может быть использован либо АТГАМ в той же дозе с той же сопроводительной терапией, либо Тимоглобулин (кроличий антиtimoцитарный глобулин, Genzyme) в дозе 3,5 мг/кг x 5 дней (курсовая доза 17,5 мг/кг). Тем не менее, при достижении к 120 дню минимального ответа с четкой тенденцией к повышению показателей тромбоцитов, проведение второго курса АТГ может быть отложено по решению руководителя протокола.

Общий план протокола:



## **Комбинированная иммуносупрессивная терапия антитимоцитарным глобулином, циклоспорином А и Неуластимом (пегилированным фильграстимом).**

**Руководитель протокола : Масчан Алексей Александрович**

**Ведущие исследователи: к.м.н. Новичкова Г.А., к.м.н. Масчан М.А.**

### **Введение:**

У вашего ребенка установлен диагноз приобретенной апластической анемии. Вашему ребенку будет проведено лечение антитимоцитарным глобулином (АТГАМ), циклоспорином А (Неорал®, Новартис Фарма) и Неуластимом (пегилированный фильграстим, Ф. Хоффманн – Ля Рош).

Вашему ребенку предлагается добровольное участие в клиническом научном исследовании с целью оценки эффективности и фармакокинетики Неуластима. Предлагаемая информация содержит объяснения, важные для принятия решения о том насколько участие в данном исследовании отвечает интересам вашего ребенка. Если у Вас сохраняются вопросы, на которые данное информированное согласие не ответило, Вам необходимы дополнительные объяснения или если в данном информированном согласии есть непонятные слова, ваш лечащий врач, заведующий отделением или руководитель исследования предоставят Вам дополнительную информацию.

### **Цели и структура исследования:**

Целью данного научного исследования является изучение способности Неуластима вызывать повышение лейкоцитов у детей с апластическими анемиями, а также длительности его действия.

### **Обоснование целесообразности назначения Неуластима:**

Одним из проявлений апластической анемии является снижение количества гранулоцитов – той части лейкоцитов крови, которые обеспечивают защиту от бактериальных и грибковых инфекций. Падение количества этих клеток до  $<500/\text{мм}^3$  приводит к резкому возрастанию риска тяжелых и даже смертельных инфекций.

Даже при эффективном лечении апластической анемии уровень лейкоцитов повышается очень медленно и в течение многих недель и даже месяцев может оставаться критически низким.

Применение препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора позволяет повысить число гранулоцитов у более 80% детей с апластическими анемиями, причем у половины пациентов это повышение достигается в течение 2-3 недель от начала лечения. К сожалению, стандартные препараты гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

имеют короткий период циркуляции в крови и требуют ежедневного подкожного введения, что болезненно для детей и неудобно для родителей и персонала.

Неуластим представляет собой молекулу гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (филграстима) к которой присоединена молекула полиэтиленгликоля. Это изменение позволяет достичь очень длительной циркуляции препарата в крови и снизить частоту введения до 1 раза в 2 недели.

Таким образом, Неуластим может повысить комфорт пациента при одинаковом эффекте по сравнению с обычными препаратами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

### **Исследование эффективности Неуластима у детей**

Неуластим исследован у нескольких десятков детей с опухолевыми заболеваниями, получающими химиотерапию. Препарат хорошо переносился, был эффективен при однократном введении и по вызываемым побочным эффектам не отличался от стандартного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

### **Процедуры, предписанные протоколом:**

Если Вы дадите разрешение на участие Вашего ребенка в исследовании Вам будет необходимо подписать данное информированное согласие до проведения любого исследования, предусмотренного протоколом. Вы и Ваш ребенок получите информацию касающуюся исследований согласно способности Вашего ребенка понять данную информацию.

### **Лабораторные исследования во время проведения исследования:**

После 2-го введения Неуластима вашему ребенку будет ежедневно забираться кровь в течение 3-х недель для определения его концентрации в сыворотке крови. Все взятия крови осуществляются из центрального венозного катетера.

Помимо взятий крови для определения концентрации Неуластима Вашему ребенку будут регулярно выполнять клинические и биохимические анализы крови, а также определение концентрации циклоспорина А.

### **Возможная польза исследования:**

Ожидаемое повышение числа гранулоцитов обезопасит Вашего ребенка от тяжелых грибковых и бактериальных инфекций.

Проведенное исследование фармакокинетики Неуластима позволят выработать оптимальный режим дозирования препарата.

### **Предвидимые опасности и неудобства:**

Любые медикаменты, в том числе и принимаемые Вашим ребенком в данном исследовании могут вызвать нежелательные явления (побочные эффекты). Побочные эффекты, которые могут возникнуть в ходе данного исследования могут быть связаны с неприятными

### Дополнительные вопросы:

Согласен/согласна

/ \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 фамилия                      имя                      отчество

число: / / /



Учетная форма 1. Фармакокинетика филграстима 1 (после 2-го введения)