https://doi.org/10.17116/terarkh201789718-24

© Коллектив авторов, 2017

Абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток CD34+ в периферической крови перед процедурой лейкафереза как параметр, прогнозирующий эффективность сбора стволовых клеток

И.В. ГАЛЬЦЕВА, Ю.О. ДАВЫДОВА, Т.В. ГАПОНОВА, Н.М. КАПРАНОВ, Л.А. КУЗЬМИНА, В.В. ТРОИЦКАЯ, Е.О. ГРИБАНОВА, С.К. КРАВЧЕНКО, Я.К. МАНГАСАРОВА, Е.Е. ЗВОНКОВ, Е.Н. ПАРОВИЧНИКОВА, Л.П. МЕНДЕЛЕЕВА, В.Г. САВЧЕНКО

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Выявление параметра, прогнозирующего сбор не менее $2 \cdot 10^6$ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) CD34+ на 1 кг массы тела (МТ) пациента за одну процедуру лейкафереза (ЛА).

Материалы и методы. В исследование включили 189 пациентов с онкогематологическими заболеваниями и 3 доноров ГСК, которым проведена мобилизация стволовых клеток с последующим их сбором методом ЛА. У каждого пациента (донора) определяли абсолютное количество лейкоцитов и клеток CD34+ в периферической крови перед процедурой ЛА, а также количество клеток CD34+ на 1 кг МТ пациента в продукте ЛА, заготовленного в этот же день.

Результаты. Корреляции между количеством лейкоцитов в крови и количеством заготовленных в продукте ЛА клеток CD34+ на 1 кг МТ не выявлено. Выявлена тесная корреляция между количеством клеток CD34+ в периферической крови до ЛА с количеством собранных ГСК, рассчитанных на МТ пациента.

Заключение. Определено оптимальное абсолютное число клеток CD34+ в крови — 20 в 1 мкл, при котором за один ЛА возможно собрать $2 \cdot 10^6$ и более клеток CD34+ на 1 кг МТ.

Ключевые слова: мобилизация, гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, лейкаферез, проточная цитофлуориметрия.

Absolute numbers of peripheral blood CD34+ hematopoietic stem cells prior to a leukapheresis procedure as a parameter predicting the efficiency of stem cell collection

I.V. GALTSEVA, Yu.O. DAVYDOVA, T.V. GAPONOVA, N.M. KAPRANOV, L.A. KUZMINA, V.V. TROITSKAYA, E.O. GRIBANOVA, S.K. KRAVCHENKO, Ya.K. MANGASAROVA, E.E. ZVONKOV, E.N. PAROVICHNIKOVA, L.P. MENDELEEVA, V.G. SAVCHENKO

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Aim. To identify a parameter predicting a collection of at least $2 \cdot 10^6$ CD34+ hematopoietic stem cells (HSC)/kg body weight per leukapheresis (LA) procedure.

Subjects and methods. The investigation included 189 patients with hematological malignancies and 3 HSC donors, who underwent mobilization of stem cells with their subsequent collection by LA. Absolute numbers of peripheral blood leukocytes and CD34+ cells before a LA procedure, as well as a number of CD34+ cells/kg body weight (BW) in the LA product stored on the same day were determined in each patient (donor).

Results. There was no correlation between the number of leukocytes and that of stored CD34+ cells/kg BW. There was a close correlation between the count of peripheral blood CD34+ cells prior to LA and that of collected CD34+ cells calculated with reference to kg BW.

Conclusion. The optimal absolute blood CD34+ cell count was estimated to 20 per μl, at which a LA procedure makes it possible to collect $2 \cdot 10^6$ or more CD34+ cells/kg BW.

Keywords: mobilization, hematopoietic stem cells, hematopoietic stem cell transplantation, leukapheresis, flow cytofluorometry.

ГКСФ — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГСК — гемопоэтические стволовые клетки
КМ — костный мозг
ЛА — лейкаферез
ЛК — лейкоконцентрат
МТ — масса тела
ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз
ЦФ — циклофосфамид
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
AUC — area under curve
CD — cluster of differentiation
FITC — fluorescein isothiocyanate
ISHAGE — International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
PE — phycoerythrin

Аутологичные и аллогенные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) CD34+ периферической крови наряду с костным мозгом (КМ) широко используются для трансплантации при различных онкогематологических и аутоиммунных заболеваниях. При обычных условиях количество стволовых клеток CD34+ в крови крайне мало и составляет 0,01—0,05% от всех лейкоцитов. Для увеличения количества ГСК в крови применяют препараты, стимули-

рующие пролиферацию клеток $CD34^+$ в КМ и усиливающие их миграцию в кровеносное русло. Для этой цели используют ростовой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ). Процесс быстрого увеличения количества стволовых клеток в крови называют мобилизацией [1—3]. Мобилизованные ГСК концентрируют и собирают с помощью процедуры лейкафереза (ЛА). Использование мобилизованных ГСК крови в трансплантации имеет ряд преимуществ: не требуется проведения экструзии КМ и наркоза, а период восстановления кроветворения у реципиентов более короткий по сравнению с реципиентами, получавшими в качестве трансплантата КМ. При этом в продукте ЛА (лейкоконцентрате — ЛК) содержится большее количество лимфоцитов донора, что повышает риск развития такого опасного осложнения трансплантации аллогенных ГСК, как реакция трансплантат против хозяина. Восстановление гемопоэза при трансплантации аутологичных ГСК происходит быстрее, что уменьшает вероятность развития инфекционных и геморрагических осложнений. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что для наиболее адекватного восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии необходимо введение $2{\cdot}10^6$ клеток $CD34^+$ и более на 1 кг массы тела (МТ) пациента [4, 5].

Мобилизацию стволовых клеток у больных можно проводить по двух схемам: только с помощью ГКСФ при «стабильном кроветворении» или в сочетании с миелосупрессивной химиотерапией (например, циклофосфамидом) и последующим назначением ГКСФ [1]. Применение разных режимов мобилизации приводит к тому, что кинетика «выхода» ГСК в кровь и изменение количества лейкоцитов у больных резко варьирует. Для сбора не менее $2{\cdot}10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ у пациентов с гемобластозами требуется проведение от одной до четырех процедур ЛА. Принятие решения о времени проведения первой процедуры ЛА является ключевым моментом в мобилизации ГСК. В ряде протоколов начало сбора клеток определяется количеством лейкоцитов в крови или количеством клеток $CD34^+$ в крови.

В данной работе мы поставили цель определить параметры, которые коррелируют с количеством собранных клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ пациента за одну процедуру ЛА. Для этого мы определяли количество лейкоцитов и количество стволовых клеток $CD34^+$ в периферической крови непосредственно перед началом процедуры ЛА и подсчитывали количество клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ в продукте ЛА, проведенного в тот же день.

Материалы и методы

Пациенты. В период с мая 2015 г. по октябрь 2016 г. проведено 208 исследований у 189 пациентов (100 мужчины, 89 женщин, медиана возраста 51 год, медиана массы тела 75 кг) и у 3 доноров аллогенных ГСК. В исследование включили 98 пациентов с множественной миеломой, 19 — с острым Т-лимфобластным лейкозом, 10 — лимфомой Ходжкина, 53 — с В-клеточными лимфомами, 9 — с Т-клеточными лимфомами. Мобилизацию стволовых клеток проводили в двух режимах: применяли только ГКСФ в дозе 10 мкг/кг/сут в течение 5—6 дней на фоне стабильного состояния кроветворения (17 пациентов, 20 исследований) или использовали химиотерапевтические препараты с последующим введением ГКСФ в дозе 5—10 мкг/кг/сут. В зависимости от примененных химиотерапевтических препаратов выделили 4 группы пациентов: с введением циклофосфамида (ЦФ) в дозе 4 г/м^2 (85 пациентов, 90 исследований), мобилизация ГСК по протоколу ОЛЛ-2009 после 3-го курса консолидации после восстановления кроветворения (19 пациентов, 19 исследований), использование режима DHAP: дексаметазон 40 мг, цисплатин 100 мг/м^2, цитарабин 2 г/м^2 (45 пациентов, 50 исследований) и применение других схем мобилизации ГСК у пациентов с лимфомами: ЛБ-М-04, DA-R-EPOCH, ESGAP, IGEV, NHL-BFM-90, SMILE, TL-REZ-09, R-HMA, R-BAC (26 пациентов, 29 исследований). У каждого пациента непосредственно перед процедурой ЛА определяли содержание лейкоцитов в крови и абсолютное количество $CD34^+$ в 1 мкл. Измерение абсолютного количества клеток $CD34^+$ при мобилизации ГСК на стабильном кроветворении начинали при количестве лейкоцитов $5{\cdot}10^9$/л, а при применении комбинированных режимов мобилизации с цитостатическими препаратами — при количестве лейкоцитов не менее $1{\cdot}10^9$/л. Процедуру ЛА осуществляли с помощью системы COBE Spectra («Cobe Laboratories, Quedgeley», Великобритания). Анализ данных проводили в зависимости и независимо от схемы мобилизации ГСК.

Подсчет клеток $CD34^+$. Абсолютное количество клеток $CD34^+$ как в крови, так и в ЛК определяли на основании 2-платформенного алгоритма согласно протоколу ISHAGE методом проточной цитофлуориметрии [6].

Образцы периферической крови с антикоагулянтом ЭДТА и ЛК окрашивали моноклональными антителами анти-CD45 FITC (клон 2D1) и анти-CD34 PE (клон 8G12) и раствором 7-аминоактиномицина D для определения жизнеспособности клеток («Becton Dickinson», США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II («Becton Dickinson», США) с подсчетом доли клеток $CD34^+$ от событий $CD45^+$, соответствующим лейкоцитам. Кроме того, в образцах периферической крови и ЛК

Сведения об авторах:

Давыдова Юлия Олеговна — врач клинической лабораторной диагностики лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга

Гапонова Татьяна Владимировна — зав. научно-клиническим отд. процессинга клеток крови и криокосервирования

Капранов Николай Михайлович — лаборант-исследователь лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга

Кузьмина Лариса Анатольевна — зав. научно-клиническим отд-нием высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга

Троицкая Вера Витальевна — зав. научно-клиническим отд-нием химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения

Грибанова Елена Олеговна — зав. научно-клиническим отд-нием химиотерапии гематологических заболеваний

Кравченко Сергей Кириллович — зав. научно-клиническим отд-нием химиотерапии гемобластозов

Мангасарова Яна Константиновна — врач-гематолог научно-клинического отд-ния химиотерапии гемобластозов

Звонков Евгений Евгеньевич — зав. научно-клиническим отд-нием химиотерапии лимфом

Паровичникова Елена Николаевна — зав. научно-клиническим отд. химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга

Менделеева Лариса Павловна — зам. генерального директора ГНЦ по инновациям и научной работе

Савченко Валерий Григорьевич — генеральный директор ФГБУ ГНЦ МЗ России

Контактная информация:

Гальцева Ирина Владимировна — зав. лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга; 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4; тел.: +7(495)612-6212; e-mail: irinagaltseva@gmail.com

подсчитывали количество лейкоцитов с помощью гематологического анализатора. Абсолютное количество клеток CD34+ в мкл в крови рассчитывали по формуле 1.

$$\text{абсолютное содержание СД34+(клеток/мкл) в крови} = \frac{\text{доля СД34+клеток(\%)}\cdot\text{количество лейкоцитов в МКЛ}}{100\%}$$

Содержание клеток CD34+ на 1 кг МТ пациента в заготовленном ЛК рассчитывали по формуле 2.

$$\text{абсолютное содержание СД34+(клеток/кг) в ЛК} = \frac{\text{доля СД34+клеток(\%)}\cdot\text{количество ядросодержащих клеток в ЛК.}}{100\%)\cdot\text{МТ пациентов (кг)}}$$

Статистический анализ. Проводили определение статистически значимых различий между параметрами абсолютного количества лейкоцитов и клеток CD34+ в крови перед проведением ЛА, а также количества клеток CD34+ на 1 кг МТ в заготовленном ЛК в зависимости от режима мобилизации. Данные представлены в виде среднего ± стандартной ошибки среднего. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро—Уилка. Для распределений, отличных от нормального, определение различий проводили, используя критерий Манна—Уитни.

Выполняли регрессионный анализ — поиск линейной зависимости между количеством заготовленных в ЛК клеток CD34+ на 1 кг МТ и количеством лейкоцитов, а также абсолютным количеством CD34+ в 1 мкл в периферической крови непосредственно перед проведением первой процедуры ЛА с определением коэффициента детерминации (R^2). Статистически значимыми признавали различия при $p<0,05$. Проводили ROC-анализ для определения количества лейкоцитов, а также абсолютного количества CD34+ в 1 мкл в периферической крови непосредственно перед проведением первой процедуры ЛА, при которой наиболее вероятно за одну процедуру собрать не менее $2\cdot10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ. Статистический анализ выполнен с помощью программного дополнения XLSTAT 2015.1 для Microsoft Excel.

Результаты

По результатам 208 исследований, количество лейкоцитов в крови перед проведением ЛА варьировало от $1,10\cdot10^9$ до $63,00\cdot10^9$/л, среднее $(14,66\pm0,94)\cdot10^9$/л; абсолютное содержание клеток CD34+ варьировало от 1,79 до 1341,05 в 1 мкл, среднее — 63,59±8,43 в 1 мкл. Количество собранных за одну процедуру ЛА клеток CD34+ варьировало от $0,13\cdot10^6$ до $88,40\cdot10^6$ на 1 кг МТ, среднее — $5,04\cdot10^6\pm0,57\cdot10^6$ на 1 кг МТ.

Данные по количеству лейкоцитов и клеток CD34+ в периферической крови до сбора ГСК и количестве собранных за одну процедуру ЛА клеток CD34+ в зависимости от примененного режима мобилизации ГСК представлены в **таблице**.

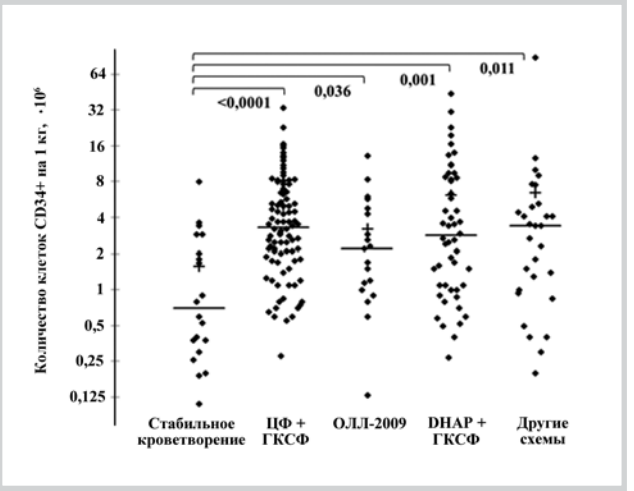


Рис. 1. **Скатерограммы распределения собранного количества клеток CD34+ за одну процедуру ЛА у групп пациентов в зависимости от режима мобилизации ГСК.**

Так как выборки не соответствовали нормальному распределению ($p<0,05$), то для нахождения достоверных отличий применяли критерий Манна—Уитни. Установлено, что на стабильном кроветворении количество лейкоцитов в крови после мобилизации достоверно выше, чем при применении цитостатических препаратов до введения ГКСФ: ЦФ ($p<0,0001$), ОЛЛ-2009 ($p=0,047$), DHAP ($p<0,0001$), а также других схем ($p=0,035$). Однако количество мобилизованных клеток CD34+ в крови при стабильном кроветворении достоверно меньше, чем при применении цитостатических режимов мобилизации: ЦФ ($p=0,001$), ОЛЛ-2009 ($p=0,032$), DHAP ($p=0,002$) и другие схемы ($p=0,031$), как и количество собранных клеток CD34+ в заготовленном ЛК **(рис. 1)**. Среди режимов с использованием различных химиотерапевтических препаратов для мобилизации ГСК достоверно меньшее количество лейкоцитов характерно для режимов ЦФ и DHAP по сравнению с ОЛЛ-2009 ($p=0,001$ и $p=0,000$ соответствен-

Количество лейкоцитов, абсолютное количество клеток CD34+ в крови, количество клеток CD34+·10⁶ на 1 кг МТ в ЛК и оптимальное пороговое количество клеток CD34+ в крови до сбора ГСК

Параметр	Стабильное кроветворение	ЦФ + ГКСФ	ОЛЛ-2009	DHAP + ГКСФ	Другие схемы
Число исследованных ЛК	20	90	19	50	29
Число лейкоцитов в крови, $\cdot10^9$/л	29,47±2,71	10,83±0,93	23,33±3,94	10,12±1,76	18,45±3,05
Абсолютное число клеток CD34+ в 1 мкл в крови	21,71±5,98	54,24±5,40	49,56±10,68	84,22±20,08	95,13±46,59
Число клеток CD34+ 10^6 на 1 кг МТ в ЛК	1,57±0,43	5,07±0,78	3,24±0,78	6,22±1,20	6,49±3,04
Доля ЛК, в которых собрано $\geqslant2\cdot10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ	30% (6 из 20)	72,22% (65 из 90)	52,63% (10 из 19)	60% (30 из 50)	58,62% (17 из 29)
Оптимальное пороговое число клеток CD34+ в крови до сбора ГСК, при котором удается собрать не менее $2\cdot10^6$ CD34+ на 1 кг МТ, в 1 мкл	25	22	25	25	21

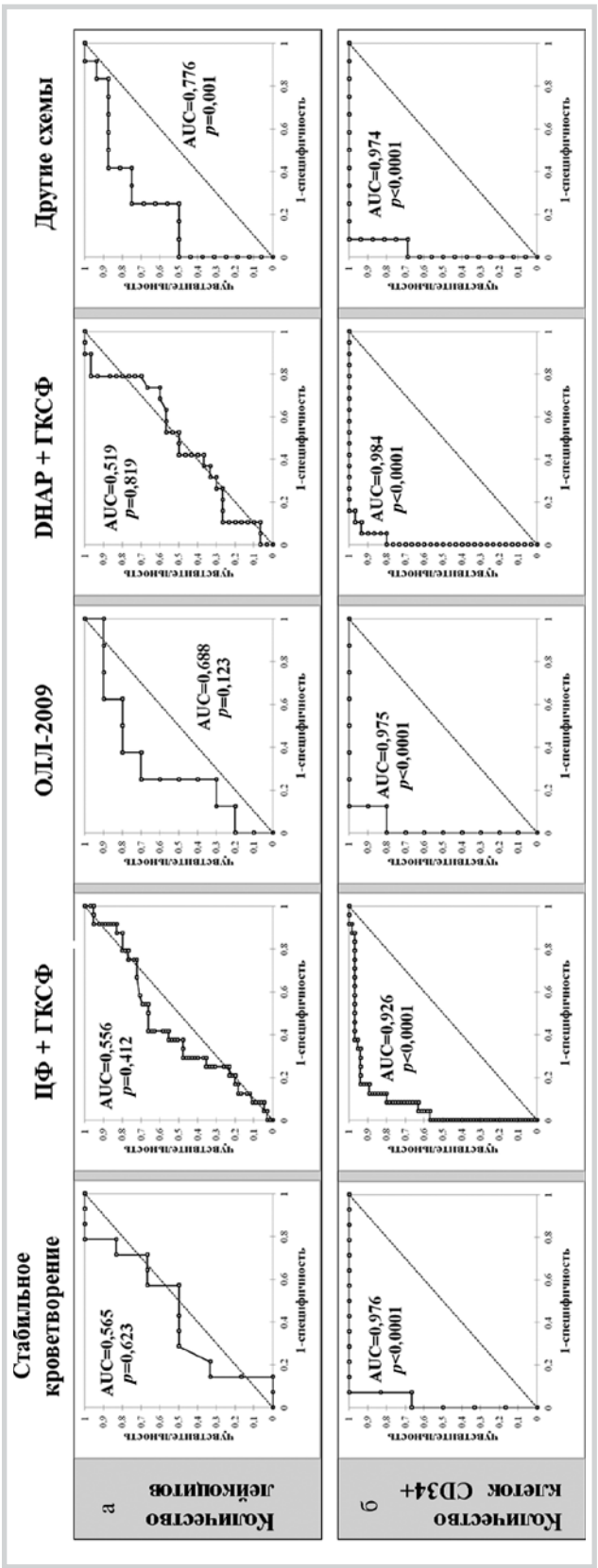


Рис. 2. **ROC-кривые для количества лейкоцитов (а) и клеток CD34+ (б) в периферической крови, от которого зависит сбор не менее $2 \cdot 10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА**

но). Достоверных различий по абсолютному числу клеток CD34+ в крови до сбора ГСК и количеству заготовленных клеток CD34+ в ЛК между различными режимами с цитостатическими препаратами не выявлено. Достоверно меньшая доля ЛА, при которых собрано $\geqslant 2 \cdot 10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ в одном ЛК, характерна только для мобилизации при стабильном кроветворении по сравнению с режимами мобилизации с применением ЦФ и DHAP (**см. таблицу**; p=0,001 и 0,030 соответственно).

Для определения оптимального порогового абсолютного числа клеток CD34+ и абсолютного количества лейкоцитов в периферической крови перед проведением ЛА, при котором наиболее вероятен успешный сбор не менее $2 \cdot 10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ за одну процедуру, нами проведен ROC-анализ для различных режимов мобилизации **(рис. 2)**. Анализ ROC-кривых показал, что количество лейкоцитов в крови до ЛА не является параметром, определяющим эффективность сбора при большинстве типов мобилизации ГСК. Только для режимов мобилизации ЛБ-М-04, DA-R-EPOCH, ESGAP, IGEV, NHL-BFM-90, SMILE, TL-REZ-09, R-HMA и R-BAC площадь под ROC-кривой достоверно больше 0,5 и составила 0,776. Для этих режимов оптимальное пороговое количество лейкоцитов в крови, при котором удается собрать не менее $2 \cdot 10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ, составило $11 \cdot 10^9$/л (чувствительность 75% и специфичность 75%).

Для всех режимов мобилизации абсолютное количество клеток CD34+ в периферической крови предопределяло количество собранных ГСК за одну процедуру ЛА. Однако мы выявили минимальные различия в оптимальном пороговом количестве клеток CD34+ в крови для разных режимов мобилизации, которое при стабильном кроветворении составило 25 в 1 мкл (чувствительность 100% и специфичность 93%), при мобилизации с помощью ЦФ — 22 в 1 мкл (чувствительность 94% и специфичность 83%), на протоколе ОЛЛ-2009 — 25 в 1 мкл (чувствительность 100% и специфичность 88%), при применении режима DHAP — 25 в 1 мкл (чувствительность 93% и специфичность 95%), а при мобилизации клеток у пациентов с лимфомами по другим режимам, отличным от DHAP, — 21 в 1 мкл (чувствительность 100% и специфичность 92%; **см. таблицу**).

При анализе данных вне зависимости от схемы мобилизации ГСК выявлено наличие тесной связи между количеством заготовленных в одном ЛК клеток CD34+ на 1 кг МТ и абсолютным количеством CD34+ в 1 мкл в периферической крови непосредственно перед проведением процедуры ЛА (R^2=0,831; p<0,0001; **рис. 3, а**). Между количеством лейкоцитов в периферической крови перед сбором ГСК и количеством заготовленных клеток CD34+ на 1 кг МТ корреляции не найдено (R^2=0,000; p=0,816; **рис. 3, б**). Это указывает на то, что именно количество клеток CD34+ в крови определяет количество собранных клеток CD34+ на 1 кг МТ в ЛК, а не количество лейкоцитов в периферической крови.

ROC-анализ показал, что сбор не менее $2 \cdot 10^6$ клеток CD34+ на 1 кг МТ не зависит от количества лейкоцитов в периферической крови перед ЛА. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,517 **(рис. 4, а)**, и достоверных отличий от AUC = 0,5 не выявлено (p=0,690).

Для абсолютного содержания клеток CD34+ площадь под кривой AUC составила 0,954 **(рис. 4, б)** и достоверно

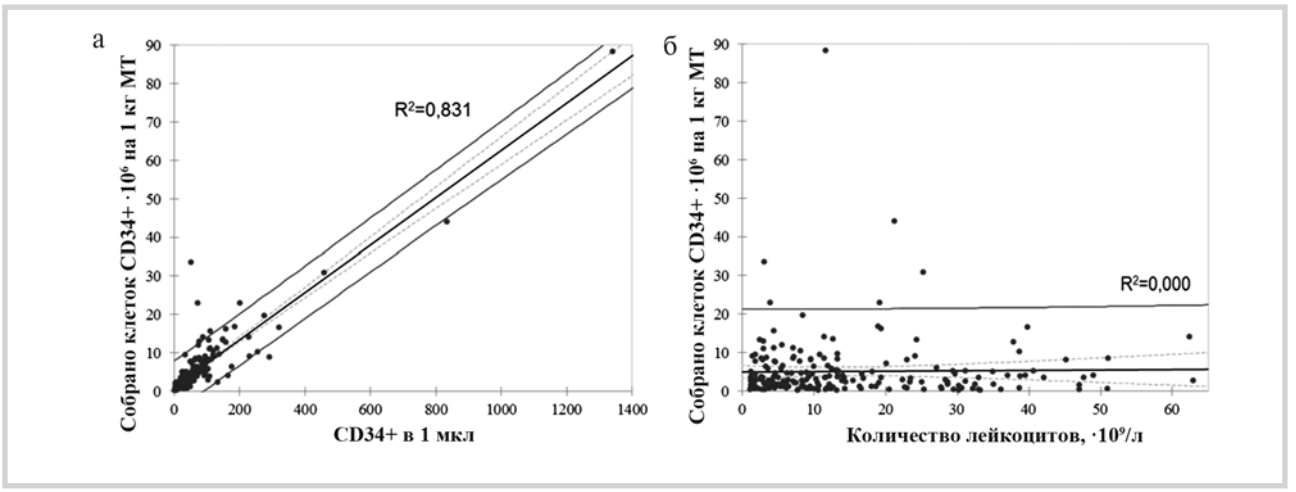


Рис. 3. **Регрессионный анализ зависимости количества собранных за одну процедуру клеток CD34⁺ на 1 кг МТ от количества клеток CD34⁺ (а) и количества лейкоцитов (б) в периферической крови перед проведением ЛА.**

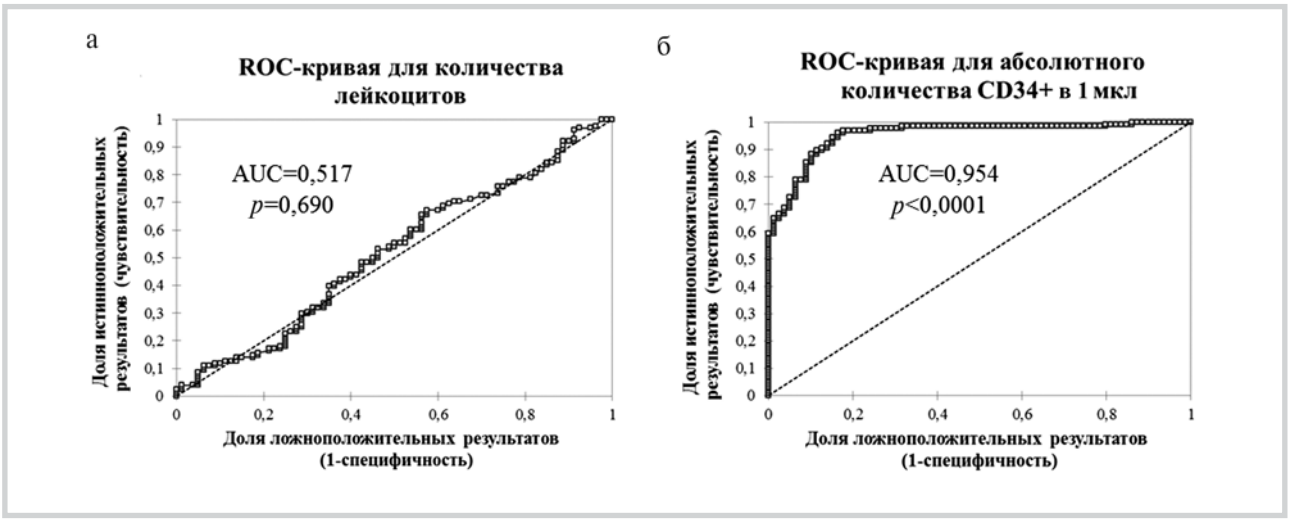


Рис. 4. **ROC-кривые для количества лейкоцитов (а) и абсолютного количества клеток CD34⁺ в периферической крови (б) как параметров, которые определяют сбор не менее 2·10⁶ клеток CD34⁺ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА независимо от режимов мобилизации.**

отличалась от 0,5 (p<0,0001). В ходе ROC-анализа выявлено, что оптимальным пороговым количеством клеток CD34⁺ в крови, при котором удается собрать 2·10⁶ клеток CD34⁺ на 1 кг МТ и более, является 20 клеток CD34⁺ в 1 мкл непосредственно перед сбором ГСК. В 79 ЛА не удалось собрать 2·10⁶ клеток CD34⁺ на 1 кг МТ за одну процедуру, и среди них только в 13 (16,4%) случаях перед процедурой ЛА у пациента имелось более 20 клеток CD34⁺ в 1 мкл. В результате исследований 128 ЛА собрано 2·10⁶ и более клеток CD34⁺ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА, среди которых только в 5 (3,9%) случаях имелось менее 20 клеток CD34⁺ в 1 мкл в крови перед процедурой. Таким образом, чувствительность выбранного порогового количества составила 96,1%, а специфичность — 83,6%. Из 207 исследований в 136 количество клеток CD34⁺ в 1 мкл в периферической крови составило 20 и более, из них в 123 (90,4%) случаях удалось выполнить сбор 2·10⁶ и более клеток CD34⁺ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА.

Обсуждение

Для трансплантации аллогенных и аутологичных ГСК часто используют мобилизованные стволовые клетки периферической крови. После проведения режима кондиционирования необходимо переливание хотя бы 2·10⁶ клеток CD34⁺ на 1 кг МТ для успешного восстановления кроветворения и уменьшения риска развития геморрагических и инфекционных осложнений. Вследствие применения разных режимов мобилизации число процедур ЛА необходимых для сбора достаточного количества стволовых клеток варьирует. Вычисление оптимального параметра, позволяющего определить время начала сбора ГСК, является важным для их мобилизации и заготовки. Оптимальным является сбор 2·10⁶ и более клеток CD34⁺ на 1 кг МТ всего за одну процедуру ЛА. Это не только способствует экономической выгоде, но и уменьшает объем заготовленного ЛК, содержащего, в частности, криопро-

текторы, например диметилсульфоксид, который может вызывать побочные реакции у больных в момент введения стволовых клеток. Самым простым параметром, который часто используют для определения времени начала ЛА, является абсолютное содержание лейкоцитов в периферической крови [7]. И этим параметром иногда продолжают пользоваться в гематологических клиниках. В связи с этим мы провели работу по выявлению основного параметра, определяющего эффективность мобилизации и сбора ГСК.

В данном исследовании мы проанализировали количество лейкоцитов и клеток $CD34^+$ в периферической крови до сбора ГСК, количество заготовленных клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА, а также долю успешных сборов в зависимости от примененных режимов мобилизации ГСК. Доказано, что, несмотря на статистически значимое большее количество лейкоцитов в периферической крови у пациентов с мобилизацией ГСК на стабильном кроветворении, достоверно большее количество клеток $CD34^+$ в периферической крови и заготовленных клеток $CD34^+$ в ЛК было у пациентов с применением цитостатических препаратов до введения ГКСФ. Доля успешных сборов (при которых заготовлено не менее $2 \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ) статистически значимо меньше среди пациентов, у которых проводили мобилизацию ГСК на стабильном кроветворении. Достоверных различий по количеству клеток $CD34^+$ в крови до сбора, количеству собранных клеток $CD34^+$ за одну процедуру ЛА, а также доле успешных сборов ГСК при применении разных режимов мобилизации, включающих цитостатические препараты, не найдено.

В нашем исследовании мы показали отсутствие связи между количеством лейкоцитов в периферической крови до сбора ГСК и количеством собранных ГСК.

Показана зависимость между абсолютным количеством клеток $CD34^+$ в крови до сбора и количеством клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ в полученном ЛК, и индекс R^2 составил 0,831. Согласно ROC-анализу оптимальным количеством, при котором необходимо начинать процедуру ЛА независимо от режима мобилизации, является 20 клеток $CD34^+$ в 1 мкл. В 90,4% случаях при количестве 20 и более клеток $CD34^+$ в 1 мкл в периферической крови, удалось собрать за одну процедуру ЛА не менее $2 \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ. При анализе данных в зависимости от используемых режимов мобилизации мы показали, что абсолютное содержание клеток $CD34^+$ в крови до ЛА является параметром, определяющим эффективность сбора ГСК для всех типов мобилизации ГСК. Мы установили оптимальное пороговое количество клеток $CD34^+$ в крови для разных режимов мобилизации: на стабильном кроветворении оно составило 25 в 1 мкл, при мобилизации с помощью ЦФ — 22 в 1 мкл, на протоколе ОЛЛ-2009 — 25 в 1 мкл, при применении режима DHAP — 25 в 1 мкл, а при мобилизации клеток у пациентов с лимфомами по другим режимам — 21 в 1 мкл.

Исследования других авторов показали, что существует корреляция между абсолютным количеством клеток $CD34^+$ в крови перед ЛА и количеством собранных стволовых клеток [8—11].

В работах S. Armitage и соавт. [12] и C. Elliott и соавт. [13] также получено пороговое количество 20 в 1 мкл, в исследовании M. Boulassel [14] — 26 в 1 мкл для сбора $2 \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ. В работах T. Demirer и соавт. [15] выявлено, что необходимо 34 стволовых клетки в 1 мкл в крови; N. Schwella и соавт. [16] — 40 в 1 мкл для сбора $2{,}5 \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ. В работе Л.П. Менделеевой и соавт. [1] показано, что сбор в количестве $(2—5) \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ за одну процедуру ЛА может быть выполнен при 40 клетках $CD34^+$ в 1 мкл в периферической крови в день проведения ЛА. Различия в рассчитанных пороговых значениях клеток $CD34^+$ в периферической крови перед сбором, полученные разными авторами, могут быть обусловлены величиной выборок, разными режимами мобилизации, а также разными технологиями и оборудованием для проведения ЛА.

Заключение

В данной работе подтверждено, что абсолютное количество клеток CD34+ в периферической крови коррелирует с количеством собранных стволовых клеток в ЛК. Установлено, что количество лейкоцитов не коррелирует с количеством собранных стволовых клеток, а первая процедура ЛА может быть проведена при любом количестве лейкоцитов в крови. Учитывая полученные данные, можно рекомендовать при применении мобилизации ГСК с цитостатическими препаратами начинать подсчет клеток CD34+ в периферической крови при увеличении количества лейкоцитов в периферической крови до $1 \cdot 10^9$/л с дальнейшим каждодневным мониторингом абсолютного количества клеток $CD34^+$ в крови. Достижение количества 20 и более клеток $CD34^+$ в 1 мкл в периферической крови позволяет с высокой вероятностью за одну процедуру заготовить $2 \cdot 10^6$ клеток $CD34^+$ на 1 кг МТ независимо от режима мобилизации ГСК.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Менделеева Л.П., Савченко В.Г., Павлова О.А., Кулиев Р.Г., Любимова Л.С., Грибанова Е.О., Клясова Г.А., Демидова И.А., Момотюк К.С., Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Капланская И.Б., Митерев Г.Ю., Калинин Н.Н., Петров М.М., Пашинин А.Н., Варламова С.В., Моисеева Т.Н. Мобилизация гранулоцитарным колониестимулирующим фактором аутологичных гемопоэтических клеток крови у больных лимфомами и раком молочной железы. *Проблемы гематологии*. 1999;4:5-12.

2. Шевченко Ю.Л., Новик А.А., Кузнецов А.Н., Афанасьев Б.В., Лисуков И.А., Козлов В.А., Мясников А.А., Рукавицын О.А., Ионова Т.И., Мельниченко В.Я., Федоренко Д.А., Базий Н.И., Шаманский С.В., Кулагин А.Д., Кишитович А.В., Иванов Р.А., Городокин Г. Аутологичная трансплантация кроветворных стволовых клеток при рассеянном склерозе: результаты исследования Российской кооперативной группы клеточной терапии. *Неврологический журнал*. 2008;2:11-18.

3. Грицаев С.В., Кузяева А.А., Волошин С.В., Чубукина Ж.В., Балашова В.А., Тиранова С.А., Запреева И.М., Сельцер А.В., Абдулкадыров К.М. Заготовка трансплантата для аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным: частота и причины неудачных сборов. *РМЖ. Приложение. Онкология*. 2013;4(1):30-35.

4. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *Journal of hematotherapy*. 1992;1(4):329-341. https://doi.org/10.1089/scd.1.1992.1.329

5. Zimmerman TM, Lee WJ, Bender JG, Mick R, Williams SF. Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvests. *Bone marrow transplantation*. 1995;15(3):439-444.

6. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee IAN. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *Journal of hematotherapy*. 1996;5(3):213-226. https://doi.org/10.1089/scd.1.1996.5.213

7. Bender JG, Lum L, Unverzagt KL, Lee W, Van Epps D, George S, Coon J, Ghalie R, McLeod B, Kaizer H. Correlation of colony-forming cells, long-term culture initiating cells and CD34+ cells in apheresis products from patients mobilized for peripheral blood progenitors with different regimens. *Bone marrow transplantation*. 1994;13(4):479-485.

8. Sawant RB, Rajadhyaksha SB. Correlation of CD34+ cell yield in peripheral blood progenitor cell product with the pre-leukapheresis cell counts in peripheral blood. *JAPI*. 2005;53.

9. Sakashita AM, Kondo AT, Ribeiro AAF, Cipolletta ANF, Colesanti MV, Hamerschlak N, Kutner JM. Factors affecting autologous peripheral blood hematopoietic stem cell collections by large-volume leukapheresis: a single center experience. *Einstein (São Paulo)*. 2011;9(2):196-200. https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao1932

10. Gambell P, Herbert K, Dickinson M, Stokes K, Bressel M, Wall D, Harrison S, Prince HM. Peripheral blood CD34+ cell enumeration as a predictor of apheresis yield: an analysis of more than 1,000 collections. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2012;18(5):763-772. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.10.002

11. Chepovetsky J, Yoon S C, Blouin A G, Tindle S, Bertinelli A, Nash E, Ding WW. Roles of Peripheral Blood CD34+ Cell Count and Midpoint Collection CD34+ Cell Yield for Peripheral Blood Stem Cell Collections from Autologous Patients Mobilized by G-CSF and Plerixafor. *North American Journal of Medicine and Science.* 2013;6(2):63.

12. Armitage S, Hargreaves R, Samson D, Brennan M, Kanfer E, Navarrete C. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone marrow transplantation*. 1997;20(7):587-591.

https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1700938

13. Elliott C, Samson DM, Armitage S, Lyttelton MP, McGuigan D, Hargreaves R, Giles C, Abrahamson G, Abboudi Z, Brennan M, Kanfer EJ. When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. *Journal of clinical oncology.* 1996;14(3):970-973.

14. Boulassel MR. Associations among white blood cells, CD34+ cells and GM-CFU in predicting the optimal timing of peripheral blood stem cell collections by apheresis. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2008;56:96-98.

15. Demirer T, Ilhan O, Ayli M, Arat M, Daglı M, Ozcan M, Haznedar R, Genc Y, Fen T, Ayyildiz E, Dincer S, Arslan O, Gurman G, Konuk N, Dalva K, Uysal A, Koc H, Ozet G, Akan H. Monitoring of peripheral blood CD34+ cell counts on the first day of apheresis is highly predictive for efficient CD34+ cell yield. *Therapeutic Apheresis*. 2002;6(5):384-389. https://doi.org/10.1046/j.1526-0968.2002.00406.x

16. Schwella N, Beyer J, Schwaner I, Heuft H G, Rick O, Huhn D, Serke S, Siegert W. Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. *Journal of clinical oncology.* 1996;14(4):1114-1121.

Поступила 16.03.17