

Алгоритм получения гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови для аутологичной трансплантации

Степанов А.А.¹, Коротаев Е.В.¹, Бессмельцев С.С.², Рабинович В.И.¹, Астахова Л.П.¹,
Пономарев С.А.¹

¹АУ «Югорский НИИ клеточных технологий с банком стволовых клеток»,
Ханты-Мансийск, Россия г. Ханты-Мансийск, ул. Мира 127-Б, тел./факс (3467)32-87-46
эл. почта: glagolmail@gmail.com

²ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Резюме. В статье представлены результаты клинической апробации алгоритма пролонгирования процедуры получения гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови. Было определено, что успешность мероприятий по получению трансплантационной дозы гемопоэтических стволовых клеток в основном зависит от своевременного начала лейкоцитафереза, продолжительности операции и кратности ее проведения. Установлено, что лабораторный мониторинг количества лейкоцитов в периферической крови в процессе мобилизации гемопоэтических стволовых клеток не информативен для определения момента начала лейкоцитафереза. Достижение концентрации гемопоэтических стволовых клеток ≥ 10 клеток/мкл в периферической крови позволяет получить при лейкоцитаферезе трансплантационную дозу в 90% случаев, а если данный показатель превышает ≥ 32 клеток/мкл – трансплантационную дозу удастся получить при проведении единственной операции. Внедрение разработанного алгоритма в практику позволит сократить количество повторных операций лейкоцитафереза на 38%, уменьшить продолжительность медикаментозной мобилизации и повысить эффективность получения гемопоэтических стволовых клеток периферической крови для трансплантации.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, лейкоцитаферез

Algorithm obtaining of the hematopoietic stem cells peripheral blood for autologous transplantation.

Stepanov A.A.¹, Korotaev E.B.¹, Bessmeltsev S.S.², Rabinovich V.I.¹, Astahova L.P.¹,
Ponomarev S.A.¹

¹Ugra research Institute of cellular technologies with stem cell Bank, Khanty-Mansiysk, Russia
str. Mira 127-B, tel./fax (3467) 32-87-46, e-mail: glagolmail@gmail.com

² *FGBU "Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency", Saint-Petersburg*

Summary. The article presents the results of clinical test of the algorithm of prolongation of apheresis leukocytes for receiving the hematopoietic stem cells from peripheral blood. The success of apheresis for obtaining good doses of hematopoietic stem cells for transplantation depended from timely start of operation, the duration of the operation and its multiplicity. It is established that the laboratory monitoring of quantity of leukocytes in peripheral blood in during of mobilization of hematopoietic stem cells is not informative for definition of the moment for the start of apheresis leukocytes. We received quite enough doses of hematopoietic stem cells for transplantation in 90% of apheresis leukocytes when the concentrations of hematopoietic stem cells was been more than 10 cells/mkl in the peripheral blood. If concentrations of hematopoietic stem cells was been more than 32 cells/mkl – we have had enough dose for transplantation from an alone operation. Practical using of the algorithm will reduce the number of repeated operations of apheresis leukocytes for 38%, and it will reduce the duration of mobilize and dose of drug. As the results it will be improve the effect of obtaining of hematopoietic stem cells of peripheral blood for transplantation.

Keywords: hematopoietic stem cell, transplantation, granulocyte colony-stimulating factor, apheresis

Введение

Мониторинг клеточного состава периферической крови в раннем посттрансплантационном периоде у пациентов, страдающих множественной миеломой или лимфомами, показал, что сроки восстановления у них гемопоэза прямо коррелируют с дозой трансплантированных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1, 2]. В настоящее время основным источником получения ГСК предназначенных для трансплантации при онкогематологических заболеваниях является периферическая кровь. По данным Европейской группы трансплантации костного мозга, в 2011 году периферическая кровь служила источником ГСК в 99% случаев аутологичных и в 73% случаев аллогенных трансплантаций [3].

Несмотря на обычно низкую концентрацию ГСК в кровотоке, ее удастся многократно увеличить, применяя медикаментозную мобилизацию. Сбор ГСК осуществляют автоматическим клеточным сепаратором при помощи операции лейкоцитафереза. Эта операция обладает рядом преимуществ по сравнению с

миелоэкспузией – она мало инвазивна, а полученный материал не требует очистки от жировых включений и элементов стромы костного мозга. Однако, несмотря на развитие методов лейкоцитафереза и медикаментозной мобилизации в современной клинической практике, получить достаточную для аутотрансплантации дозу ГСК из периферической крови пациентов удастся не всегда [4]. Эти трудности связаны с кинетикой мобилизации ГСК, весьма индивидуальной вследствие специфических изменений костного мозга в результате заболевания и проводившегося лечения [5]. Как показывает практика, наиболее спорными вопросами при получении трансплантационного материала является определение момента для проведения лейкоцитафереза, выбор оптимальной продолжительности операции, и ее кратности. Использование четкого методического алгоритма позволит правильно решать эти вопросы в конкретной клинической ситуации.

В последние десятилетия гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) зарекомендовал себя в качестве эффективного средства, стимулирующего выход ГСК в периферическую кровь. Наиболее эффективно его применение в комбинации с цитостатическими препаратами [6]. После введения цитостатика начинают ежедневно подкожно вводить Г-КСФ, и концентрация ГСК в периферической крови на третий день обычно начинает повышаться, с пиком на пятый - шестой день. При максимальной концентрации ГСК и проводят операцию лейкоцитафереза [7, 6].

Момент для проведения операции лейкоцитафереза определяют, опираясь на данные мониторинга клеточного состава периферической крови. Считается, что минимальная концентрация ГСК в периферической крови, при которой возможен сбор достаточной трансплантационной дозы, составляет от 10 до 18 ГСК/мкл [8]. Такая рекомендация в значительной мере является условной, т.к. для каждого пациента требуется индивидуальная трансплантационная доза ГСК, определяемая его массой тела и планом лечения, например – необходимостью проведения двойной трансплантаций. Кроме того, не исключено, что в каждые последующие сутки концентрация ГСК в крови будет повышаться, и окажется, что лейкоцитаферез проведен преждевременно. В то же время, существует риск снижения концентрации ГСК в последующие дни, и в таком случае откладывание операции лейкоцитафереза не позволит собрать достаточную трансплантационную дозу.

Некоторые клиники в ходе стимуляции начинают мониторинг количества ГСК только после нарастания лейкоцитоза периферической крови более $1 \cdot 10^9/\text{л}$, считая, что до этого момента концентрация ГСК в периферической крови недостаточна и будет нарастать, что происходит далеко не всегда. Существует также мнение, что отсутствие

глубокой лейкопении после введения цитостатика является показателем неэффективной мобилизации, что также не является бесспорным. Получены данные подтверждающие, что динамика восстановления количества лейкоцитов при мобилизации не коррелирует с выходом ГСК в периферический кровоток [9]. С учетом вышесказанного, актуальна оптимизация протокола лабораторного контроля количества ГСК в периферической крови пациента при проведении мобилизации и создание основанного на нем прогнозирования результата лейкоцитафереза. Это позволит правильно определить момент для сбора трансплантационного материала.

Количество ГСК, полученных при лейкоцитаферезе, зависит от продолжительности операции их получения, исходной концентрации ГСК в периферической крови и кинетики этой концентрации во время самой операции. Если аппарат для цитафереза дает стабильные результаты получения ГСК, то зная их исходное количество в периферической крови и кинетику выработки во время операции, можно, управляя продолжительностью процедуры, рассчитывать на получение предсказуемого количества трансплантационного материала. Клеточные сепараторы разных производителей имеют специфические протоколы проведения операции лейкоцитафереза, иногда не позволяя корректировать параметры своей работы – например, увеличивать предельное количество обрабатываемой крови. При этом не всегда окончание протокола операции совпадает с набором достаточной дозы ГСК. В этом случае рекомендуют на следующий день на фоне продолжающейся медикаментозной мобилизации повторить лейкоцитаферез. Но, как было сказано выше, возможное падение концентрации ГСК в периферической крови на следующий день может сделать повторную операцию бессмысленной.

С другой стороны, получение количества ГСК значительно превышающего достаточную для трансплантации дозу не должно являться целью. Имеются данные, что трансплантация более 15 ГСК/кг массы тела не влияет на сроки восстановления кроветворения [10]. Продолжительная операция приводит и к нарастанию антикоагулянтной нагрузки на пациента. Следовательно, обработка чрезмерного объема крови при операции лейкоцитафереза так же не целесообразна.

Необходимо отметить, что при лечении онкогематологических больных успешный сбор трансплантационной дозы у пациента или донора является очень важным для исхода заболевания. Течение болезни часто не оставляет времени для повторной попытки получения трансплантационного материала и может определить неблагоприятный исход. Кроме того, необходимо учитывать, что Г-КСФ является не

только эффективным мобилизующим препаратом, но и способен стимулировать дифференцировку ГСК *in vivo*, что неизбежно снижает плюрипотентность и пролиферативный потенциал этих клеток. Поэтому целесообразно проведение однократного лейкоцитафереза и, по возможности, в наиболее ранние сроки, с целью сбора более ранних предшественников гемопоэза. В свою очередь, сокращение продолжительности применения Г-КСФ даже на одни сутки предпочтительнее, так как препараты данной группы способны вызывать клинически значимые побочные эффекты.

Таким образом, оптимальной является заготовка достаточной дозы ГСК при помощи единственной своевременной операции лейкоцитафереза с минимальным, но достаточным объемом обработанной крови. Разработка алгоритма такого подхода представляется актуальной задачей для осуществления успешной трансплантации в онкогематологической практике.

Материалы и методы исследования

Нами было выполнено ретроспективное, неконтролируемое клиническое исследование. Объектом исследования являлись 18 пациентов с онкогематологическими заболеваниями, которым была показана аутотрансплантация ГСК. Первая группа пациентов с множественной миеломой – 10 человек, из них 5 – мужчин и 5 женщин, в возрасте от 32 до 56 лет. Вторая группа пациентов с лимфомами – 9 человек, из них 6 мужчин и 2 женщины, в возрасте от 29 до 51 лет.

Для мобилизации ГСК в периферический кровоток пациентам, вводился внутримышечно циклофосфomid однократно 4 г/м² площади поверхности тела. Через 5 суток назначалось ежедневное подкожное введение Г-КСФ (филграстим) 10 мкг/кг массы тела, включительно до завершения получения трансплантационного материала на клеточном сепараторе Haemonetics MSC+. Необходимо было определить оптимальный момент для получения трансплантационного материала. Данная задача решалась путем ежедневного мониторинга концентрации ГСК периферической крови пациентов в течение мобилизации. Начиная с первого дня введения филграстима, проводились ежедневные утренние отборы проб периферической крови путем венепункции для определения количества ГСК. Исследование полученных проб производилось в течение 40 минут после их получения. Как только количество ГСК в периферической крови превышало уровень 10 ГСК/мкл, принималось решение о начале лейкоцитафереза. Непосредственно перед началом операции лейкоцитафереза выполнялся отбор пробы периферической крови путем венепункции для контрольного определения количества ГСК.

Для определения динамики количества ГСК в периферической крови в процессе лейкоцитафереза, при завершении стандартной программы операции лейкоцитафереза на клеточном сепараторе Haemonetics MSC+, венепункцией отбиралась проба периферической крови для исследования концентрации ГСК. Одновременно выполнялось исследование количества ГСК в аликвоте, полученной после тщательного перемешивания из продукта лейкоцитафереза. Лабораторное исследование полученных проб производилось в течение 40 мин. В случае набора трансплантационной дозы лейкоцитаферез завершали. Если трансплантационная доза не была набрана, а количество ГСК в периферической крови сохранялось не менее 10 ГСК/мкл, то лейкоцитаферез продолжали. Если же уровень ГСК в периферической крови становился ниже данного значения, но трансплантационная доза не была набрана, тогда лейкоцитаферез прекращали. Затем продолжали введение Г-КСФ и проводили повторный лейкоцитаферез через 8 – 12 часов, если уровень ГСК в периферической крови был не менее 10 ГСК/мкл. В противном случае мероприятия по получению трансплантационного материала откладывали на несколько месяцев, в зависимости от клинической ситуации.

Разработанный нами алгоритм пролонгирования процедур получения трансплантационного материала представлен в виде схемы на рис. 1.

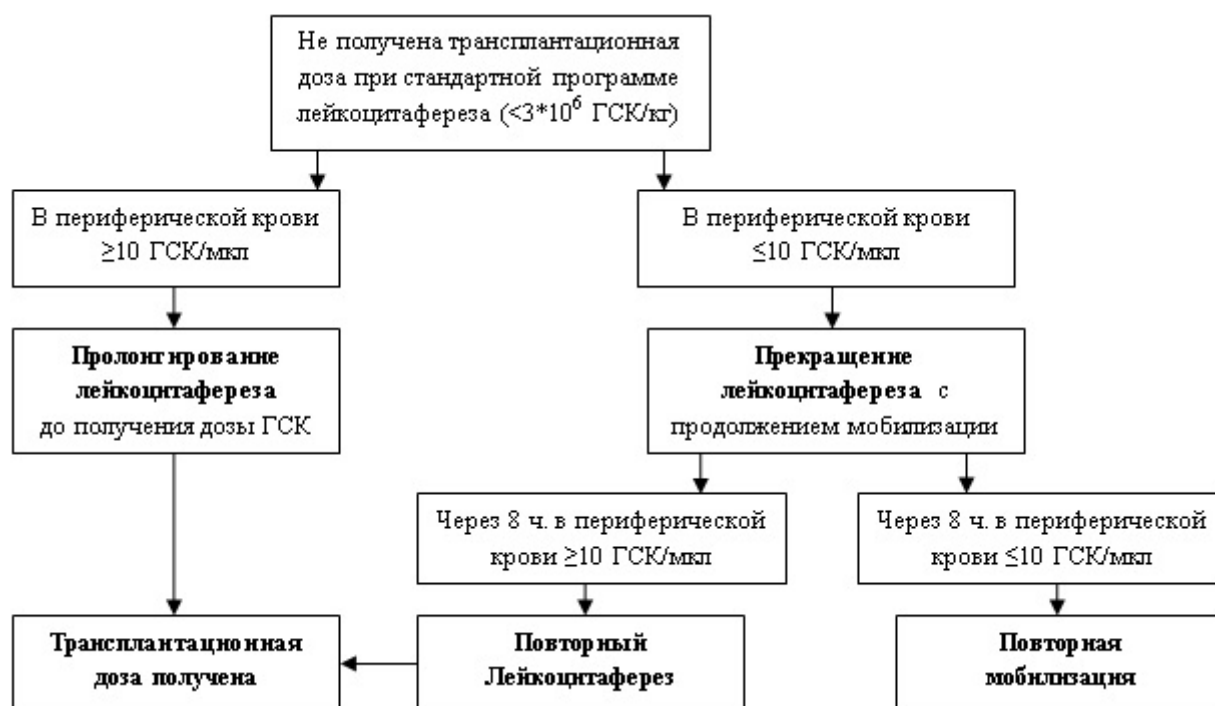


Рисунок 1. Алгоритм процедур получения трансплантационного материала.

Для определения количества ГСК применяли проточный цитометр CYTOMICS FC 500 с набором моноклональных антител CD34+, CD45+ и витального красителя 7AAD «Stem-KitReagents». Исследования проводили по международному протоколу ISHAGE. Подсчет лейкоцитов выполнялся с помощью световой микроскопии с фотодокументирующей системой в камере Горяева.

Для оценки нормальности распределения в группах применялся критерий Пирсона. Для анализа различий между группами применялся критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждения

Медикаментозная мобилизация ГСК

В процессе мобилизации у 16 из 18 пациентов превышение концентрации лейкоцитов более $1 \cdot 10^9/\text{л}$ наблюдалось на 4 суток раньше, чем была достигнута концентрация ГСК 10 клеток/мкл. У 2 пациентов, напротив, концентрация ГСК достигала целевого значения, прежде чем произошло восстановление из лейкоцитопении до $1 \cdot 10^9/\text{л}$. Таким образом, лабораторный мониторинг количества лейкоцитов в процессе мобилизации не может служить надежным критерием определения момента для начала лейкоцитафереза.

В целом, у всех 18 пациентов в процессе медикаментозной мобилизации была достигнута целевая концентрация ГСК в периферической крови не ниже 10 ГСК/мкл (10 – 140 ГСК/мкл) в широком диапазоне на 5 – 17 сутки.

Критерий согласия Пирсона позволил выявить, что распределение значений количества ГСК в обследованных группах не соответствует закону нормального распределения. Это обусловлено нерандомизированным формированием групп, так как лейкоцитаферез не начинали пока количество ГСК в периферической крови не достигнет уровня ≥ 10 ГСК/мкл. Таким образом, для описания групп применяли медиану, а для статистической оценки различий между группами был выбран непараметрический критерий Манна-Уитни.

Медиана количества ГСК периферической крови в группе пациентов с множественной миеломой в момент начала процедуры лейкоцитафереза составила 26 ГСК/мкл. В группе пациентов с лимфомами этот показатель составил 31,5 ГСК/мкл.

Статистический анализ с помощью критерия Манна-Уитни показал отсутствие достоверных различий по эффективности мобилизации ГСК между группами пациентов с миеломой и лимфомой ($p \leq 0,05$). Возможно, это обусловлено тем, что механизм нарушения лимфо- или миелопоэза при множественной миеломе и лимфоме, и влияние филграстима на пролиферацию и выброс в кровяное русло ГСК никак не связаны между

собой в процессе кроветворения. Следовательно, эффективность мобилизации филграстимом не зависит от механизма нарушения гемопоэза.

С учетом полученных данных, для дальнейшего анализа все пациенты были объединены в одну группу вне зависимости от нозологии.

Лейкоцитаферез периферической крови

У 5 из 18 пациентов, по завершению стандартной программы лейкоцитафереза на цитосепараторе Haemonetics MSC+, в течение 8 часов была получена трансплантационная доза $\geq 3 \cdot 10^6$ ГСК/кг массы тела.

За час до завершения стандартной программы лейкоцитафереза на цитосепараторе Haemonetics MSC+ у 5 из остальных 13 пациентов, которым при этом не была набрана трансплантационная доза, количество ГСК в периферической крови оставалось на уровне ≥ 10 ГСК/мкл. Лейкоцитаферез у этих 5 пациентов был пролонгирован и трансплантационная доза, спустя несколько часов, получена.

У оставшихся 8 пациентов, которым не удалось набрать трансплантационную дозу при стандартной программе лейкоцитафереза на цитосепараторе Haemonetics MSC+, количество ГСК в периферической крови в конце операции оказалось ниже 10 ГСК/мкл. Операция была остановлена и введение филграстима продолжено. У 6 из этих 8 пациентов через 6 - 8 ч. после окончания первого лейкоцитафереза количество ГСК в периферической крови вновь повысилось более 10 ГСК/мкл. Им был выполнен повторный лейкоцитаферез и трансплантационная доза в итоге набрана.

Таким образом, разработанный алгоритм пролонгирования процедуры лейкоцитафереза позволил сократить количество повторных операций на 38% (5 из 18 пациентов), и в итоге удалось получить трансплантационную дозу в 90% клинических случаев (16 из 18 пациентов).

У 2 пациентов, которым лейкоцитаферез был остановлен, и количество ГСК в периферической крови на следующие сутки оставалось ниже 10 ГСК/мкл, все мероприятия направленные на получение ГСК были прекращены. Через несколько недель им была проведена повторная мобилизация с введением цитостатика, Г-КСФ и последующим лейкоцитаферезом. Трансплантационная доза была накоплена в общем итоге двух попыток стимуляции.

Корреляционный анализ показал совершенно очевидно, что результаты лейкоцитафереза прямо зависят от количества ГСК в периферической крови в момент начала процедуры ($r = 0,654$, $p \leq 0,01$).

На рисунке 2 видно, что у 8 пациентов, получивших однократный лейкоцитаферез по стандартному или пролонгированному протоколу, операция завершилась получением трансплантационной дозы – $\geq 3 \cdot 10^6$ ГСК/кг массы тела. Проекция точки пересечения вертикальной прямой с линией тренда на ось результатов мобилизации показывает, что это было возможно при исходной концентрации ГСК в периферической крови ≥ 32 клеток/мкл. Кроме того, на рисунке 2 показано, что у тех 10 пациентов, у которых данный уровень концентрации ГСК не достигнут в процессе медикаментозной мобилизации, возникла необходимость в повторном лейкоцитаферезе. Следовательно, концентрация ГСК в периферической крови ≥ 32 клеток/мкл, позволяет рассчитывать на получение трансплантационной дозы при однократном лейкоцитаферезе по стандартной или пролонгированной программе.

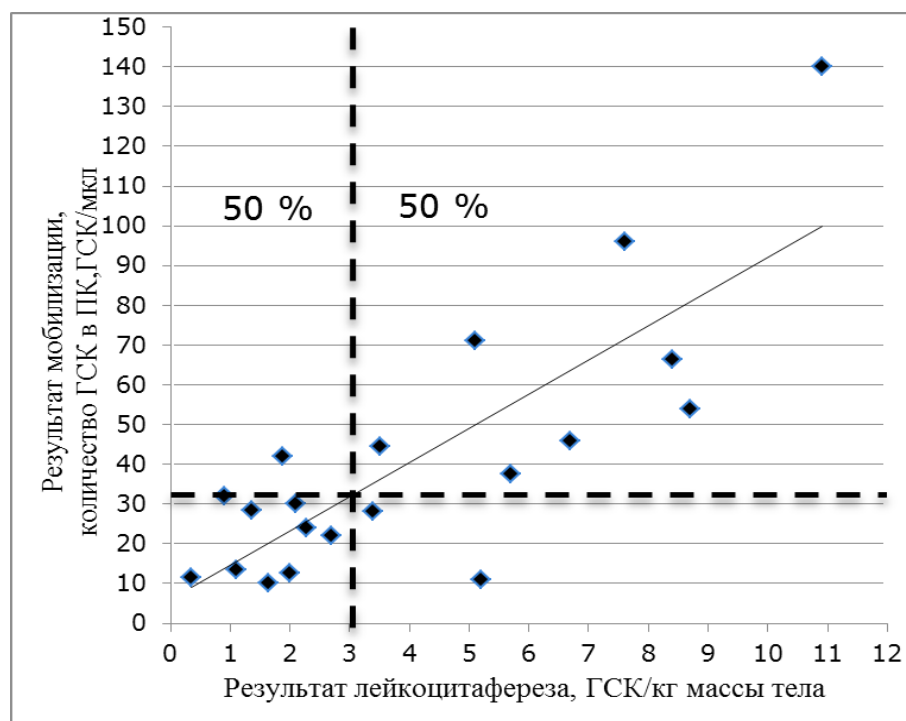


Рисунок 2. График зависимости количества ГСК в продукте лейкоцитафереза от количества ГСК в периферической крови.

Примечание. вертикальная пунктирная линия разделяет результаты по величине полученной трансплантационной дозы - $3 \cdot 10^6$ ГСК/кг; горизонтальная пунктирная линия показывает концентрацию ГСК в периферической крови пациентов, при которой была получена трансплантационная доза $> 3 \cdot 10^6$ ГСК/кг в ходе однократного лейкоцитафереза.

На рис. 2 с помощью линии тренда показан линейный характер зависимости количества ГСК в продукте лейкоцитафереза от исходного количества ГСК в периферической крови в момент начала лейкоцитафереза. Определив тангенс угла наклона линии тренда, можно получить константу в уравнение линейной функции:

Предполагаемая величина полученной дозы ГСК/кг массы тела = $k \cdot A$, где k – угловой коэффициент, равный тангенсу угла наклона линии тренда (в нашем случае $k=0,098$); A – исходное количество ГСК в периферической крови.

Полученная формула позволяет прогнозировать результат лейкоцитафереза, зная количество ГСК в периферической крови до начала процедуры. Это может быть полезно в тех клинических ситуациях, когда количество ГСК в периферической крови, в момент принятия решения о выполнении повторного лейкоцитафереза, оказывается ниже рекомендованного значения (< 10 ГСК/мкл).

Выводы:

1. Лабораторный мониторинг количества лейкоцитов в периферической крови пациента в ходе мобилизации не может служить надежным критерием определения момента для начала операции лейкоцитафереза.
2. Количество ГСК в периферической крови пациента в ходе мобилизации в диапазоне от 10 до 32 ГСК/мкл является оптимальным для проведения лейкоцитафереза.
3. Разработанный алгоритм обоснования управляемой тактики сбора аутотрансплантационного материала в конкретных клинических ситуациях позволит избежать повторного лейкоцитафереза, сократить медикаментозную мобилизацию и получать достаточную трансплантационную дозу ГСК.

Литература

1. Bolwell B.J., Pohlman B., Rybicki L., et al. Patients mobilizing large numbers of CD34+ cells ('super mobilizers') have improved survival in autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies // Bone Marrow Transplantation. – 2007 – Vol. 40, N 5. – P. 437 – 441.
2. Wahlin A., Eriksson M., Hultdin M. Relation between harvest success and outcome after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma // European Journal of Haematology. – 2004. – Vol. 73, N 4. – P. 263 – 268.
3. Passweg J.R., Baldomero H., et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011 // Bone Marrow Transplantation. – 2013. – Vol. 1. – P. 1 – 7.

4. Афанасьев Б.В., Забелина Т.С., Зубаровская Л.С. Методика пересадки кроветворных периферических клеток в клинику: Методическое пособие для врачей-онкологов, гематологов и науч. работников. – СПб., 1996. – 14 с.
5. Stiff P.J. Management strategies for hard-to-mobilize patient // Bone Marrow Transplantation. – 1999. – Vol. 23. – P. 29 – 33.
6. Narayanasami U., Kanteti R., Morelli J. Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation // Blood. – 2001. – Vol. 98, N 7. – P. 2059 – 2064.
7. Linker C., Anderlini P., Herzig R., Recombinant human thrombopoietin augments mobilization of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2003. – Vol. 9, N 6. – P. 405 – 413.
8. Менделеева Л.П., Покровская О.С., Урнова Е.С. Мобилизация препаратом филграстима – граногеном аутологичных гемопоэтических стволовых клеток крови у больных с онкогематологическими заболеваниями // Гематология и трансфузиология. – 2009. – Т. 54, №3. – С. 31 – 36.
9. Alexeev S., Babenko E., Estrina M. at al. Factors influencing stem cell mobilization in patients with hematologic malignancies and solid tumors // Cellular Therapy and Transplantation. – 2009 – Vol. 1, № 3. – P. 61 – 65.
10. Пугачев А.А. Восстановление кроветворения после различных видов трансплантации стволовых гемопоэтических клеток // Материалы 1 Российско-американской конференции «Биотехнология и Онкология», Санкт-Петербург, 29 – 31 мая 2005 г, С. 127 – 128.