

**КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И КОЛИЧЕСТВО CD34+ КЛЕТОК В ПРОДУКТЕ
ЛЕЙКОЦИТАФЕРЕЗА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ МОБИЛИЗАЦИИ У
БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ**

Балашова В.А., Чубукина Ж.В., Кострома И.И., Жернякова А.А., Запреева И.М.,
Семенова Н.Ю., Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Чечеткин А.В., Грицаев С.В.

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Россия, 191024,
Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16, тел./факс (812) 274-56-50 / (812) 717-25-50,
e-mail: RNIINT@mail.ru, bloodscience@mail.ru*

Резюме

Цель работы – сравнить колониеобразующую способность (КОС) и количество CD34+ клеток в продукте лейкоцитафереза, заготовленного у больных множественной миеломой (ММ) после режима мобилизации (РМ) с введением циклофосфана (Цф) и винорелбина

Материалы и методы. Выполнен ретроспективный анализ результатов заготовки аутооттрансплантата и последующей аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК) у 71 больного ММ в возрасте от 26 до 67 лет, из которых были сформированы две группы. В группе 1 для мобилизации был использован Цф в дозе 3 г/м², а в группе 2 – винорелбин в дозе 35 мг/м². Все больные дополнительно получали подкожные инъекции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в суточной дозе 10 мкг/кг. Лейкоцитаферез инициировали при количестве CD34⁺ клеток ≥ 20 в 1 мкл крови.

Колониеобразующую способность оценивали по результатам 14-дневного культивирования клеток продукта афереза в среде MethoCult H4435 согласно стандартной методике. CD34⁺ клетки определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США) с использованием набора реагентов «Stem-KIT Reagents» («Beckman Coulter», США).

В качестве предтрансплантационной подготовки использовались режимы кондиционирования Mel200, Mel140, BEAM, а также комбинация мелфалана с тиотепой.

В посттрансплантационном периоде всем больным, за исключением пятерых, назначался Г-КСФ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов.

Результаты. По результатам культуральных исследований не выявлено значимого различия в количестве колониеобразующих клеток (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э и общих КОЕ) в продукте афереза, заготовленного после РМ с введением Цф и винорелбина.

Интенсивность РМ также не влияла и на содержание CD34+ клеток в продукте лейкоцитафереза: различие в количестве клеток не достигало значимых величин: $1,67 \times 10^9/\text{л}$ и $1,68 \times 10^9/\text{л}$; $p > 0,05$.

Режим кондиционирования Mel200 чаще использовался при выполнении первой АутоТГСК, а режим Mel140 – при повторной трансплантации. Установлено, что при использовании трансплантата, заготовленного после введения Цф, восстановление нейтрофилов наступало значимо раньше после повторной АутоТГСК: на 9 и 10 дни после первой трансплантации; $p = 0,0007$. В случае использования аутоотрансплантата, заготовленного после введения винорелбина, разницы в сроках восстановления кроветворения после перво и повторной АутоТГСК не было.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о сопоставимости мобилизационного потенциала винорелбина и промежуточных доз циклофосфана, несмотря на меньшую миелотоксичность первого.

Ключевые слова: множественная миелома, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, мобилизация, циклофосфан, винорелбин.

COLONYFORMING CAPCITY OF HAEMATOPOIETIC STEM CELLS AND CD34+ CELLS NUMBER IN THE PRODUCT OF APHERESIS AFTER DIFFERENT MOBILIZATION REGIMENS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Balashova V.A., Chubukina Zh. V., Kostroma I.I., Zhernyakova A.A., Zapreeva I.M., Semenova N.J., Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Chechetkin A.V., Gritsaev S.V.

FSBI Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,
St. Petersburg, Russia

Summary

The aim of the work was to compare colonyforming capacity and CD34+cells number in the product of aphaeresis received in patients with multiple myeloma (MM) after mobilization regimens (MR) with cyclophosphamide (CY) or vinorelbine.

Methods. Data of 71 MM patients were retrospectively analyzed. The patients' age was 26-67 years.

Two groups of patients were formed according to the MR variant: with CY (group 1) and with vinorelbine (group 2).

Aphaeresis was initiated when CD34⁺ cells number was $\geq 20/1 \mu\text{L}$ of peripheral blood.

MethoCult H4435 medium was used to study colonyforming capacity.

CD34⁺ cells were determined by using flow laser cytofluorimeter «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», USA).

Conditioning regimens used before autotransplant infusions were next: Mel200, Mel140, BEAM, or combination of melphalan with thiothepa.

Statistical processing of the data was carried out using standard statistical methods.

Results. According to the cultural research there was no any difference in the colonyforming capacity of aphaeresis product getting after MR with CY or vinorelbine. The intensity of MP did not influence on the CD34⁺ cells number too: $1.67 \times 10^9/\text{L}$ and $1.68 \times 10^9/\text{L}$ accordingly; $p > 0.05$.

Conditioning regimen Mel200 was used more often for the first autotransplantation and regimen Mel140 was used more often for the second one. In the cases with CY used for RM autografting of neutrophils was faster after the second transplantation than after the first one: 9 and 10 days accordingly; $p = 0.0007$. If vinorelbine was used for RM there was no difference in durability of posttransplantation agranulocytosis after the first and the second transplantation.

Conclusion. The capacity of CY and vinorelbine used for stem cell mobilization from bone marrow to peripheral blood are equivalent.

Key words: multiple myeloma, autologous stem cell transplantation, mobilization, cyclophosphamide, vinorelbine.

Введение

Целью высокодозной консолидирующей терапии больных множественной миеломой (ММ) является улучшение качества ответа, если, например, на индукционном этапе не удалось достигнуть полного ответа, и/или дальнейшая редукция объема патологического клона с одновременным подавлением субклонов, потенциально являющихся источником развития рецидива заболевания в постремиссионном периоде [1]. В итоге создаются условия, обеспечивающие возможность для длительного периода беспрогрессивной и, возможно, общей выживаемости [2]. Тем не менее, одного введения мелфалана в режиме монотерапии или комбинации с другими лекарственными препаратами недостаточно для благополучного решения поставленной цели. Необходимо

наличие другого, принципиального, условия, которым является своевременное и надежное восстановление кроветворения в постцитостатическом периоде, предупреждающее, с одной стороны, развитие тяжелых, потенциально опасных для жизни больного, инфекционных и геморрагических осложнений, а с другой – создающее плацдарм для своевременной инициации полноценной поддерживающей терапии.

Для решения указанной проблемы используются предварительно заготовленные аутологичные (собственные) гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) больного или, иначе говоря, ауотрансплантат. Качество ауотрансплантата, которое определяет вероятность и скорость разрешения постцитостатической аплазии костного мозга, оценивается, прежде всего, по количеству заготовленных ГСК, суррогатным маркером которых является количество $CD34^+$ клеток. Другим, не менее важным критерием полноценности ауотрансплантата, является сохранность пролиферативной и дифференцирующей способности ГСК, косвенно о которых можно судить по результатам культивирования клеток *in vitro*.

Репопулятивный потенциал ГСК зависит от многих факторов, ассоциированных с больным и проводимым лечением. Повреждающее воздействие могут оказывать и составляющие этапов заготовки, хранения и размораживания клеточной взвеси, к числу которых относятся, в частности, лекарственные препараты, используемые в составе режима мобилизации (РМ) ГСК из костного мозга в периферическую кровь. Актуальность проблемы негативного воздействия цитостатиков РМ обоснована сложившейся к настоящему времени ситуацией, а именно возможностью выбора из числа апробированных и обладающих разной выраженностью миелотоксического эффекта режимов, а также активным внедрением в рутинную клиническую практику ингибитора CXCR4 плериксафора [3-5].

Цель данной работы – сравнить колониобразующую способность (КОС) и количество $CD34^+$ клеток в продукте лейкоцитафереза, заготовленного у больных ММ после РМ с введением циклофосфана (Цф) и винорелбина.

Материалы и методы

Для решения сформулированной цели был выполнен ретроспективный анализ результатов заготовки ауотрансплантата и последующей аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АуоТГСК) у 71 больного ММ в возрасте от 26 до 67 лет, медиана 56 лет. Мужчин было 28 и женщин – 43.

По виду цитостатического препарата, входящего в состав РМ, больные были распределены в 2 группы. В группе 1 был использован Цф в дозе 3 г/м². Во второй группе в качестве химиотерапевтической составляющей РМ назначался винорелбин в дозе 35

мг/м². После введения цитостатика больные получали подкожные инъекции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) в суточной дозе 10 мкг/кг, включая утро дня последнего сеанса афереза. Процедуры лейкоцитафереза инициировали при числе CD34⁺ клеток ≥ 20 в 1 мкл крови.

Колониеобразующую способность оценивали по результатам 14-дневного культивирования клеток продукта афереза в среде MethoCult H4435 согласно стандартной методике. Количество культивируемых клеток в 1 мл среды составляло 1×10^5 . Подсчитывали отдельно количество гранулоцито-макрофагальных (КОЕ-ГМ) и эритроидных (БОЕ-Э) колоний, а также суммарное количество колоний (общие КОЕ).

CD34⁺ клетки определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США) с использованием набора реагентов «Stem-KIT Reagents» («Beckman Coulter», США).

При проведении АутоТГСК в качестве предтрансплантационной подготовки использовались схемы с внутривенным введением мелфалана в монорежиме по 200 (Mel200) или 140 (Mel140) мг/м², а также комбинированные схемы: тиотепа с мелфаланом, BEAM.

В посттрансплантационном периоде всем больным, за исключением пятерых, назначался Г-КСФ. Датой приживления трансплантата считали день достижения показателя абсолютного числа нейтрофилов (АЧН) $\geq 0,5 \times 10^9$ /л, сохраняющегося в течение 3 последовательных дней.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов.

Результаты

В группу 1, в которой для мобилизации был использован циклофосфана, вошли 45 больных в возрасте 26-66 лет, медиана 53 года. Суммарно в этой группе было выполнено 74 АутоТГСК, включая 40 первых и 34 повторных трансплантаций. В качестве режима кондиционирования перед проведением первой АутоТГСК были использованы схемы Mel200, Mel140 и тиотепа с мелфаланом у 34-х, 4-х и 2-х больных соответственно. При повторной АутоТГСК схемы Mel200, Mel140 и BEAM были применены у 16-ти, 17-ти и 1-го больного соответственно.

Группу 2 была сформирована из 26 больных в возрасте от 37 до 67 лет, медиана 58,5 лет. Общее число выполненных трансплантаций составило 34, из которых 25 были первыми и 9 повторными. Схемы Mel200, Mel140 и тиотепа с мелфаланом назначались 13, 8 и 4 больным соответственно при первой АутоТГСК, а при повторной – 3, 4 и 2 больным соответственно.

Более подробно анализируемые клинико-гематологические показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-гематологические показатели больных ММ в группах с разными режимами мобилизации

Показатель	Группа 1, Цф + Г-КСФ	Группа 2, Винорелбин + Г-КСФ
Больные, n	45	26
Возраст	53 (26-66)	58,5 (37-67)
Вариант ММ		
IgG	27	16
IgA	10	8
IgD	0	1
Бенс-Джонса	7	1
Несекретирующая	1	0
Первая/повторная АутоТГСК	40 / 34	25 / 9
Ответ перед первой / повторной АутоТГСК		
ПО	21 / 17	10 / 3
ОХЧО	7 / 7	2 / 2
ЧО	12 / 10	13 / 4
Режимы кондиционирования при первой / повторной АутоТГСК		
Mel200	34 / 16	13 / 3
Mel140	4 / 17	7 / 5
Thio/Mel	2 / 0	5 / 1
BEAM	0 / 1	0 / 0
Г-КСФ после первой / повторной АутоТГСК		
	39 / 34	22 / 8

Таким образом, режим кондиционирования с введением мелфалана в дозе 200 мг/м² чаще использовался при первой нежели при повторной АутоТГСК: 47 (72,3%) и 19 (44,2%) соответственно; $p=0,004$. Напротив, мелфалан в дозе 140 мг/м² был приоритетной схемой при выполнении повторной трансплантации: 21 (48,8%) против 12 (18,5%) при первой АутоТГСК; $p<0,001$.

В целом 71 больному ММ, включенных в исследование, было проведено 108 АутоТГСК: 65 первых и 43 повторных.

По результатам изучения КОС не выявлено значимого различия в количестве КОЕ-ГМ, БОЕ-Э и общих КОЕ в продукте афереза, заготовленного после двух разных по интенсивности РМ, а именно с введением циклофосфана и винорелбина; $p>0,05$ для всех показателей (таблица 2).

Таблица 2. Колониеобразующая способность клеток в продукте афереза после двух режимов мобилизации

Режим мобилизации	Число колоний, 10 ⁵ /клеток в культуральной среде,
-------------------	---

	медиана (диапазон)		
	КОЕ-ГМ	БОЕ-Э	Общее КОЕ
Винорелбин+Г-КСФ	164 (15-269)	212 (60-286)	400 (125-600)
Циклофосфан+Г-КСФ	160 (33-300)	200 (78-300)	360 (210-600)

При оценке содержания $CD34^+$ клеток в продукте афереза после использования Цф и винорелбина в составе РМ также не обнаружено значимых различий: $1,67 \times 10^9/\text{л}$ ($0,23-4,71 \times 10^9/\text{л}$) и $1,68 \times 10^9/\text{л}$ ($0,37-3,38 \times 10^9/\text{л}$) соответственно; $p > 0,05$.

Учитывая значимые различия в интенсивности режимов кондиционирования при проведении первой и повторной АутоТГСК, влияние КОС клеток аутотрансплантата на сроки восстановления АЧН было изучено в группах с разным порядковым номером трансплантации. Установлено, что при проведении АутоТГСК с использованием трансплантата, заготовленного с включением Цф в состав режима мобилизации, содержание АЧН $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ наступало раньше при проведении повторной нежели первой трансплантации: на 9 и 10 дни соответственно; $p = 0,0007$. При использовании трансплантата, заготовленного после назначения винорелбина, разницы в сроках восстановления нейтрофилов при проведении первой и повторной АутоТГСК не выявлено (таблица 3).

Таблица 3. Сроки восстановления нейтрофилов в посттрансплантационном периоде в зависимости от количества КОЕ-ГМ

Режим мобилизации	Порядковый номер АутоТГСК	Количество КОЕ-ГМ, Ме (диапазон)	День АЧН $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ Ме (диапазон)	p
Циклофосфан + Г-КСФ, n=45	Первая, n=40	164,9 (33 – 300)	10 (8 – 16)	0,0007
	Повторная, n=34	134,5 (33 – 300)	9 (6 – 12)	
Винорелбин + Г-КСФ, n=26	Первая, n=25	164,7 (15 – 269)	10 (9 – 20)	0,857
	Повторная, n=9	187 (112 – 252)	10 (9 – 17)	

Обсуждение

Обнадёживающие результаты при включении аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в состав лечебного пособия больным ММ, а именно снижение риска прогрессии заболевания и возможное увеличение общей выживаемости, являются основанием существенно расширить возрастные границы для проведения данного вида высокотехнологичной медицинской помощи [6]. Вместе с тем повышение числа сопутствующих заболеваний в совокупности со снижением общесоматического

статуса у пожилых людей оправдывает применение более щадящих режимов химиотерапевтического воздействия на организм возрастных больных. Частным примером может быть использование винорелбина в качестве цитостатической составляющей режима мобилизации [7,8]. Более того, как было установлено нами ранее, применение винорелбина в комбинации с Г-КСФ обладает таким важным клиническим преимуществом как возможность более корректно спрогнозировать сроки заготовки аутооттрансплантата при значимо низкой токсичности по сравнению с промежуточными дозами циклофосфана [9].

Аутооттрансплантат, заготовленный после внутривенного введения винорелбина в дозе 35 мг/м², содержит меньшее количество CD34-позитивных клеток нежели в случае назначения Цф в дозе 3 г/м² [10,11]. Несмотря на это, в большинстве случаев их содержание было выше субоптимального уровня, т.е. в объеме достаточном для выполнения как минимум одной АутоТГСК. Не менее важной находкой было обнаружение способности винорелбина преодолевать негативное влияние длительного приема леналидомида на количественный состав аутооттрансплантата.

Заключение

Результаты данного исследования объясняют причину вышеперечисленных находок: сопоставимость мобилизационного потенциала винорелбина и промежуточных доз циклофосфана, несмотря на меньшую миелотоксичность первого. Подтверждением данного феномена являются сроки приживания трансплантата. В свою очередь выявленное различие в длительности постцитостатического агранулоцитоза после первой и повторной АутоТГСК, когда в состав РМ был включен циклофосфан, следует расценивать, прежде всего, как следствие разных по интенсивности режимов кондиционирования.

Таким образом, результаты настоящего и предшествующих исследований [8-11] дают основание рассматривать комбинацию внутривенно вводимого винорелбина в дозе 35 мг/м² в совокупности с последующим подкожным назначением Г-КСФ в качестве одной из схем алгоритма выбора режима мобилизации ГСК из костного мозга в периферическую кровь при заготовке аутооттрансплантата у больных ММ. Данный РМ предпочтителен, прежде всего, для лиц старшей возрастной группы, особенно в случае запланированной одиночной АутоТГСК и, в том числе, с использованием меньших, чем стандартные, доз мелфалана, а также больным с коморбидностью, когда использование высокодозного Цф может быть сопряжено с риском развития нежелательных осложнений.

Список литературы

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома: руководство для врачей. М.: МК, 2016. Кол-во стр, 512 с. [Bessmeltsev S.S., Abdulkadyrov K.M. Mnozhestvennaya mieloma: rukovodstvo dlya vrachei. (Multiple myeloma: manual for physicians.) Moscow: MK Publ.; 2016. 504 p. (In Russ)].
2. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone with transplantation for myeloma. N Engl J Med. 2017;376(14):1311-20.
3. Грицаев С.В., Кузяева А.А., Бессмельцев С.С. Отдельные аспекты трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток больным множественной миеломой. Клиническая онкогематология. 2017;10(1):7-12. [Gricaev S.V., Kuzyaeva A.A., Bessmeltsev S.S. Certain aspects of autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. Clinical oncohematology. 2017;10(1):7-12. (In Russ)].
4. Кострома И.И., Жернякова А.А., Грицаев С.В. Отдельные аспекты заготовки аутотрансплантата у больных множественной миеломой. Вопросы онкологии. 2019;65(4):504-9. [Kostroma I.I., Zhernyakova A.A., Gricaev S.V. Some aspects of autotransplant collection in patients with multiple myeloma. Voprosy onkologii. 2019;65(4):504-9. (In Rus)].
5. Bargetzi M.J., Passweg J., Baertschi E. et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells with vinorelbine and granulocyte colony-stimulating factor in multiple myeloma patients is reliable and cost effective. Bone Marrow Transplant. 2003;31(2):99-103.
6. Muchtar E., Dingli D., Kumar S. et al. Autologous stem cell transplantation for multiple myeloma patients 70 years or older. Bone Marrow Transplant. 2016;51(11):1449-55.
7. Samaras P., Pfrommer S., Seifert B. et al. Efficacy of vinorelbine plus granulocyte colony-stimulation factor for CD34+ hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(1):74-80.
8. Грицаев С.В., Кузяева А.А., Кострома И.И. и др. Первый опыт мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь винорелбином у больных лимфопролиферативными заболеваниями. Медицина экстремальных ситуаций. 2017;4:30-5. [Gricaev S.V., Kuzyaeva A.A., Kostroma I.I. i dr. The first experience of stem cell mobilization from bone marrow into peripheral blood with vinorelbine in patients with multiple myeloma. Medicina ekstremal'nyh situacij. 2017;4:30-5. (In Russ)].
9. Грицаев С.В., Кострома И.И., Чубукина Ж.В. и др. Сравнительная эффективность винорелбина и циклофосфана в режиме мобилизации для заготовки аутотрансплантата. Medline.ru. 2017;18:409-24. [Gricaev S.V., Kostroma I.I., Chubukina Zh.V. i dr. Comparative

effectiveness of vinorelbine and cyclophosphamide as mobilization regimen for autotransplant harvesting. WWW. MEDLINE.RU. 2017;18:409-24. (In Russ)].

10. Кострома И.И., Жернякова А.А., Чубукина Ж.В. и др. Факторы, связанные с эффективной заготовкой и приживлением аутотрансплантата у пациентов с множественной миеломой. Клиническая онкогематология. 2019;12(1):32-36. [Kostroma I.I., Zhernyakova A.A., Chubukina Zh.V. i dr. Factors associated with efficient harvesting and engraftment of auto-transplants in multiple myeloma patients. Clinical oncohematology. 2019;12(1):32-6. (In Russ)].

11. Кострома И.И., Жернякова А.А., Чубукина Ж.В. и др. Заготовка гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой: влияние леналидомида в индукционной терапии и режима мобилизации. Клиническая онкогематология. 2018; 11(2):192-7. [Kostroma I.I., Zhernyakova A.A., Chubukina Zh.V. i dr. Hematopoietic stem cell collection in multiple myeloma patients: influence of the lenalidomide-based therapy and mobilization regimen prior to auto-HSCT. Clinical oncohematology. 2018;11(2):192-7. (In Russ)].