

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-140-149>

Факторы, ассоциированные с количеством CD34-позитивных гемопоэтических клеток-предшественниц в лейкоконцентрате у пациентов с лимфомами и острыми Т-лимфобластными лейкозами

И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, М.Л. Канаева, К.А. Никифорова, Ю.О. Давыдова,
Н.М. Капранов, С.М. Куликов, Л.А. Кузьмина, Я.К. Мангасарова, В.В. Троицкая,
Т.В. Гапонова, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

Контакты: Ирина Владимировна Гальцева galtseva.i@blood.ru

Введение. Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток по-прежнему востребована для пациентов с гемобластомами. Известно, что пул стволовых кроветворных клеток неоднороден. Нами изучены различные факторы, связанные с предшествующим лечением, особенностями пациента до начала мобилизации и заболевания, а также состав CD34⁺-пула в периферической крови (ПК), связанный с количеством CD34⁺-клеток в 1-м лейкоконцентрате (ЛК).

Цель исследования – определить факторы, связанные с количеством клеток CD34⁺, CD34⁺CD143⁺, CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} и CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ в 1-м ЛК у пациентов с гемобластомами.

Материалы и методы. Исследованы субпопуляции стволовых кроветворных клеток в ПК и 1-м ЛК у 80 пациентов с гемобластомами (соотношение мужчин и женщин 1:1, медиана возраста 51 год). В контрольную группу вошли 24 здоровых донора. Для определения количества клеток CD34⁺, CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}, CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ и CD34⁺CD143⁺ применяли метод проточной цитометрии. Материалом для иммунофенотипического исследования служили образцы ПК пациентов до мобилизации и в 1-й день лейкафереза, а также образцы 1-го ЛК в 1-й день сбора стволовых кроветворных клеток.

Результаты. Показано, что присутствие ранних клеток-предшественниц с иммунофенотипом CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} в ПК до мобилизации связано с большим количеством CD34⁺-клеток в 1-м ЛК ($p = 0,003$). При наличии CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}-клеток в ПК до мобилизации медиана количества CD34⁺-клеток в 1-м ЛК составила 2,6 %, а при их отсутствии – 0,71 %. При использовании гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в монорезиме количество CD34⁺CD143⁺-клеток в 1-м ЛК было значимо меньше, чем при использовании режимов с химиотерапией и данным фактором ($p = 0,03$). Однако большинство (9 из 16) пациентов группы гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в монорезиме имели почечную недостаточность перед мобилизацией. Не обнаружено факторов, ассоциированных с количеством CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}-клеток в ЛК. У пациентов >60 лет количество CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻-клеток в 1-м ЛК было меньше, чем у пациентов <60 лет ($p = 0,043$). У пациентов с инфекционными осложнениями на этапе мобилизации стволовых кроветворных клеток количество CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻-клеток в 1-м ЛК было меньше, чем у пациентов без инфекционных осложнений ($p = 0,019$).

Заключение. Количество CD34⁺-клеток в 1-м ЛК связано с количеством в ПК CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}-клеток, т. е. клеток ранней стадии дифференцировки с высоким потенциалом пролиферации. Установлена связь количества CD34⁺CD143⁺-клеток в ПК до мобилизации и CD34⁺-клеток в 1-м ЛК: в парной модели – в пределах пограничных значений ($p = 0,05$), а в многофакторной ковариационной модели – с высокой достоверностью ($p = 0,0033$). Доказано, что с увеличением возраста пациента и при наличии инфекционных осложнений количество длительно репулирующих CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻-клеток уменьшается.

Ключевые слова: стволовая кроветворная клетка, проточная цитометрия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Для цитирования: Гальцева И.В., Менделеева Л.П., Канаева М.Л. и др. Факторы, ассоциированные с количеством CD34-позитивных гемопоэтических клеток-предшественниц в лейкоконцентрате у пациентов с лимфомами и острыми Т-лимфобластными лейкозами. Онкогематология 2024;19(4):140–9.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-140-149>

Factors associated with the number of CD34-positive hematopoietic progenitor cells in the leukocyte concentrate in patients with lymphomas and acute T-lymphoblastic leukemia

I.V. Galtseva, L.P. Mendeleeva, M.L. Kanaeva, K.A. Nikiforova, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, S.M. Kulikov, L.A. Kuzmina, Ya.K. Mangasarova, V.V. Troitskaya, T.V. Gaponova, E.N. Parovichnikova

National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zыkovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Irina Vladimirovna Galtseva galtseva.i@blood.ru

Background. Autologous hematopoietic stem cell transplantation remains in demand for patients with hematological malignancies. The pool of hematopoietic stem cells is known to be heterogeneous. We studied various factors associated with previous treatment, patient and disease characteristics, as well as the composition of the CD34⁺ pool in peripheral blood (PB), associated with the number of CD34⁺ cells in the first leukocyte concentrate (LC).

Aim. To determine the factors associated with CD34⁺, CD34⁺CD143⁺, CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−} and CD34⁺CD38^{+/−}HLA-DR[−] cells count in the first LC of patients with hematological malignancies.

Materials and methods. Subpopulations of hematopoietic stem cells in the PB and first LC were studied in 80 patients with hematological malignancies (male to female ratio 1:1, median age 51 years). The control group included 24 healthy donors. Flow cytometry was used to determine the number of CD34⁺, CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−}, CD34⁺CD38^{+/−}HLA-DR[−] and CD34⁺CD143⁺ cells. Immunophenotyping was performed on PB samples of patients before mobilization and on the 1st day of leukapheresis, as well as on first LC samples on the 1st day of hematopoietic stem cells collection.

Results. It was shown that the presence of early progenitor cells with CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−} immunophenotype in the PB before mobilization is associated with a higher first LC CD34⁺ cells number ($p = 0.003$). In the presence of CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−} cells in the PB before mobilization, the median number of CD34⁺ cells in the first LC was 2.6 %, and in their absence – 0.71 %. When using granulocyte colony-stimulating factor as monotherapy, the CD34⁺CD143⁺ cells number in the first LC was significantly lower than when using chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor ($p = 0.03$). However, the majority (9 of 16) of patients in the granulocyte colony-stimulating factor monotherapy group had renal failure before mobilization. No factors associated with the number of CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−} cells in the first LC were found. In patients >60 years old, the number of CD34⁺CD38^{+/−}HLA-DR[−] cells in the first LC was lower than in patients <60 years old ($p = 0.043$). In patients with infectious complications during hematopoietic stem cell mobilization, the number of CD34⁺CD38^{+/−}HLA-DR[−] cells in the first LC was lower than in patients without them ($p = 0.019$).

Conclusion. The first LC number of CD34⁺ cells is associated with PB number of CD34⁺CD38⁺HLA-DR^{+/−} cells, i. e. cells of the early differentiation stage with a high proliferation potential. A relationship was established between PB CD34⁺CD143⁺ cells number before mobilization and first LC CD34⁺ cells count: in the paired model – within the borderline values ($p = 0.05$), and in the multifactorial covariance model – with high significance ($p = 0.0033$). It has been proven that with increasing patient age and in the presence of infectious complications, the number of long-term repopulating CD34⁺CD38^{+/−}HLA-DR[−] cells decreases.

Keywords: hematopoietic stem cell, flow cytometry, hematopoietic stem cell transplantation

For citation: Galtseva I.V., Mendeleeva L.P., Kanaeva M.L. et al. Factors associated with the number of CD34-positive hematopoietic progenitor cells in the leukocyte concentrate in patients with lymphomas and acute T-lymphoblastic leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2024;19(4):140–9. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-140-149>

Введение

Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) по-прежнему востребована для лечения пациентов с гемобластозами. Показателем, определяющим эффективность сбора стволовых кроветворных клеток (СКК) для трансплантации, является количество CD34⁺-клеток в периферической крови (ПК), которое также связано со сроками восстановления гемопоэза в посттрансплантационном периоде [1–6]. Однако пул СКК неоднороден. Среди них присутствуют ранние СКК и коммитированные клетки-предшественницы [7–10]. Для ранних CD34⁺-клеток характерно отсутствие экспрессии CD38 и наличие экспрессии HLA-DR. Именно такие клетки обладают большим потенциалом к пролиферации и дифференцировке [8–11].

В конце XX века впервые были высказаны предположения об участии ренин-ангиотензиновой системы

(РАС) в регуляции гемопоэза. В 1996 г. I.C. Haznedaroğlu и соавт. подтвердили, что в костном мозге есть локальная РАС, влияющая на продукцию, пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток, которая участвует в регуляции как нормального, так и патологического гемопоэза [12]. Изучение роли основных компонентов РАС — ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (антиген CD143) и ангиотензина II — в постэмбриональном гемопоэзе привело к выводу о влиянии РАС на экстрамедуллярный гемопоэз [13, 14]. С учетом этих данных, помимо хорошо изученных антигенов CD38 и HLA-DR, признана необходимость включить в исследование популяцию CD34⁺-клеток с коэкспрессией CD143.

В ряде работ показано влияние количества CD34⁺-клеток на сроки восстановления кроветворения после трансплантации [3–6]. Однако нет данных о том, какой клинический эффект могут оказывать субпопуляции

CD34⁺-клеток, а именно экспрессирующие CD34⁺CD143⁺ и не экспрессирующие CD38 или HLA-DR (CD34⁺-CD38⁻HLA-DR⁻).

В ранее проведенном нами исследовании оценено количество клеток CD34⁺, CD34⁺CD143⁺ (табл. 1), CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ и CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} в ПК до мобилизации и после нее, а также в лейкоконцентрате (ЛК) у пациентов с гемобластомами и доноров [15]. Популяция ранних клеток-предшественниц CD34⁺-CD38⁻HLA-DR⁻ обнаруживалась только у 3 пациентов с лимфомами до мобилизации (0,4–0,6 %). У пациентов с множественной миеломой популяция ранних СКК CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} в 1-й день лейкофереза была статистически значимо меньше, чем у остальных. Одновременно с повышением общего количества CD34⁺-клеток после стимуляции кроветворения у всех пациентов увеличилось количество CD34⁺CD143⁺-клеток. Количество всех длительно репопулирующих клеток CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} было статистически значимо больше в 1-й день лейкофереза в ПК и ЛК, чем до мобилизации ($p < 0,001$), а динамика 2 компартментов мультипотентных клеток была противоположна: субпопуляция CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁻-клеток значимо больше в ПК до мобилизации, чем в 1-й день лейкофереза, а количество CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁺-клеток ниже в ПК до мобилизации, чем в 1-й день лейкофереза.

Таблица 1. Количество CD34⁺- и CD34⁺CD143⁺-клеток ($M \pm m$) в 1-м лейкоконцентрате у пациентов с множественной миеломой, лимфомами, острыми Т-лимфобластными лейкозами, доноров, %
Table 1. Number of CD34⁺ and CD34⁺CD143⁺ cells ($M \pm m$) in the first leukocyte concentrate in patients with multiple myeloma, lymphomas, acute T-lymphoblastic leukemia, donors, %

Диагноз (n) Diagnosis (n)	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD143 ⁺
Множественная миелома (53) Multiple myeloma (53)	1,47 ± 0,22	47,3 ± 1,92
Лимфомы (20) Lymphomas (20)	1,84 ± 0,46	41,5 ± 3,5
Острые Т-лимфобластные лейкозы (7) Acute T-lymphoblastic leukemia (7)	1,28 ± 0,07	43,7 ± 3,29
Доноры (24) Donors (24)	0,17 ± 0,08	20,4 ± 3,22

Цель исследования — выявить дополнительные факторы, которые могут быть связаны с количеством CD34⁺-клеток в ЛК.

Материалы и методы

Клинико-лабораторная характеристика пациентов

Исследованы субпопуляции СКК в ПК и 1-м ЛК у 80 пациентов с множественной миеломой ($n = 53$), лимфомами ($n = 20$) и острым Т-лимфобластным

лейкозом ($n = 7$). В исследование включены 40 мужчин и 40 женщин с медианой возраста 51 (19–67) год. Мобилизацию и сбор СКК всем пациентам проводили в НМИЦ гематологии в период с ноября 2014 г. по апрель 2017 г. Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в табл. 2. В качестве контроля исследовано 10 образцов ПК добровольцев в возрасте 22–34 лет (медиана возраста 29 лет) и 14 образцов 1-го ЛК доноров аллогенных СКК.

Из 20 пациентов с лимфомами у 6 был диагноз диффузной В-крупноклеточной лимфомы, у 5 – лимфомы Ходжкина, у 4 – фолликулярной лимфомы и по 1 случаю – лимфомы из клеток маргинальной зоны, анапластической крупноклеточной лимфомы, первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Поражение костного мозга не обнаружено у 13 пациентов с лимфомами из 20.

Пациентам с лимфомами до мобилизации СКК проведено 1–9 курсов химиотерапии (ХТ), пациентам с множественной миеломой – 3–16, пациентам с острым Т-лимфобластным лейкозом – 4–5. Пациентам с острым Т-лимфобластным лейкозом перед мобилизацией проводили лечение по протоколу ОЛЛ-2009. Мобилизацию СКК выполняли после 3-го или 4-го курса консолидации.

Перед мобилизацией и сбором у всех пациентов определен противоопухолевый ответ на проведенную терапию (табл. 3).

В различные сроки после мобилизации и сбора СКК 69 пациентам из 80 выполнена ауто-ТГСК. Одиннадцати пациентам, у которых выявлено прогрессирование или рецидив заболевания после индукционной ХТ, и пациентам с недостаточным ответом на проведенную индукционную терапию ауто-ТГСК не проводили (5 пациентов с множественной миеломой, 5 – с лимфомами, 1 – с острым Т-лимфобластным лейкозом).

Применяли 2 основные схемы мобилизации СКК: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в сочетании с ХТ и Г-КСФ в монорежиме. Химиотерапевтические режимы, предшествующие введению ростовых факторов, различались в зависимости от диагноза. При мобилизации СКК у 40 пациентов с множественной миеломой использовали циклофосфамид в дозе 4 г/м² с последующим введением Г-КСФ, у 9 пациентов СКК мобилизованы с помощью Г-КСФ в монорежиме (в эту группу вошли пациенты с множественной миеломой с почечной недостаточностью), 4 пациентам проводили курсы ХТ (VD-PACE, DНАР) с последующим введением Г-КСФ. Всем пациентам с острым Т-лимфобластным лейкозом мобилизацию СКК проводили с использованием Г-КСФ на фоне предшествующей терапии по протоколу ОЛЛ-2009 после 3-го или 4-го курса консолидации на стабильном кроветворении. При лимфоме Ходжкина использовали схемы R-DНАР или циклофосфамид. При неходжкинских лимфомах у большинства

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов перед мобилизацией стволовых кроветворных клеток

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of patients before hematopoietic stem cells mobilization

Параметр Parameter	Множественная миелома (n = 53) Multiple myeloma (n = 53)	Лимфомы (n = 20) Lymphomas (n = 20)	Острый Т-лимфобластный лейкоз (n = 7) Acute T-lymphoblastic leukemia (n = 7)
Возраст, лет: Age, years:			
медиана median	54	44,5	33
диапазон range	35–67	22–64	19–62
Соотношение мужчины:женщины Male to female ratio	1:1	1:1,2	1,3:1
Число проведенных курсов химиотерапии (до начала мобилизации): Number of chemotherapy courses (before mobilization):			
медиана median	7	6	5
диапазон range	3–16	1–9	4–5
Почечная недостаточность (до начала мобилизации), n (%) Renal failure (before mobilization), n (%)	9 (17)	0	0
Инфекционные осложнения (на этапе мобилизации), n (%) Infectious complications (during mobilization), n (%)	21 (40)	3 (15)	0
Уровень гемоглобина (до начала мобилиза- ции), г/л: Hemoglobin level (before mobilization), g/L:			
медиана median	128	113	94
диапазон range	103–157	86–143	76–118
Уровень лейкоцитов (до начала мобилиза- ции), × 10 ⁹ /л: Leukocyte level (before mobilization), × 10 ⁹ /L:			
медиана median	7,2	6,4	3,3
диапазон range	1,5–12,7	2,1–13,8	1,8–5,1
Уровень тромбоцитов (до начала мобили- зации), × 10 ⁹ /л: Platelet level (before mobilization), × 10 ⁹ /L:			
медиана median	225	231	275
диапазон range	126–328	79–430	115–369

Таблица 3. Противоопухолевый ответ на проведенную терапию, n (%)

Table 3. Antitumor response to therapy, n (%)

Диагноз Diagnosis	Полная ремиссия Complete remission	Очень хороший частичный ответ Very good partial response	Частичный ответ Partial response	Прогрессирование, рецидив Progression, relapse
Множественная миелома (n = 53) Multiple myeloma (n = 53)	12 (22,6)	25 (47,2)	15 (28,3)	1 (1,9)
Лимфомы (n = 20) Lymphomas (n = 20)	8 (40)	–	8 (40)	4 (5)
Острый Т-лимфобластный лейкоз (n = 7) Acute T-lymphoblastic leukemia (n = 7)	7 (100)	–	–	–

Таблица 4. Характеристики используемых моноклональных антител

Table 4. Characteristics of the monoclonal antibodies used

Антиген Antigen	Клон Clone	Флуорохром Fluorochrome
CD34	8G12	PE
CD45	2D1	FITC
CD38	HIT2	PerCP-Cy5.5
CD143	BB9	APC
HLA-DR	L243	PE-Cy7

Примечание. PE – фикоэритрин; FITC – флуоресцеин изотиоционат; PerCP-Cy5.5 – перидинин-хлорофилл-протеин-цианин 5.5; APC – аллофикоцианин; PE-Cy7 – фикоэритрин-цианин 7.

Note. PE – phycoerythrin; FITC – fluorescein isothiocyanate; PerCP-Cy5.5 – peridinin-chlorophyll-protein-cyanine 5.5; APC – allophycocyanin; PE-Cy7 – phycoerythrin-cyanine 7.

пациентов применяли протоколы ХТ, включающие сочетание нескольких химиопрепаратов (DHAP±R, R-DA-EPOCH, R-NHL-BFM-90, TL-REZ, R-HMA).

Введение Г-КСФ начинали при уменьшении числа лейкоцитов в крови $<1,0 \times 10^9/\text{л}$ и продолжали в течение 3–12 дней до завершения сбора CD34-клеток. Перед процедурой лейкафереза определяли количество клеток CD34⁺, циркулирующих в ПК. Показанием для начала сбора являлось обнаружение $\geq 10\text{--}20$ CD34⁺-клеток в мкл ПК. За 1–5 (медиана 3) сеансов собиралось достаточное количество CD34⁺-клеток. Было собрано $0,7 \times 10^6\text{--}33,5 \times 10^6$ клеток/кг массы тела, в среднем $(7,99 \pm 0,64) \times 10^6/\text{кг}$ массы тела.

Проточная цитометрия

Для определения CD34⁺, CD34⁺CD143⁺ (СКК, экспрессирующие АПФ), CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} (длительно репопулирующие) и CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ (ранние стволовые) популяций клеток в ПК и 1-м ЛК применяли метод проточной цитометрии. Исследование проводили на проточном цитометре FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Характеристика моноклональных антител, использованных для определения экспрессии исследуемых белков, представлена в табл. 4. Материалом для иммунофенотипического исследования служили образцы ПК пациентов до мобилизации. Образцы 1-го ЛК исследовались в 1-й день сбора СКК.

Образцы окрашивали в соответствии с рекомендациями D. Barnett и соавт. [16]. Образец ПК или 1-го ЛК инкубировали со смесью моноклональных антител. После этого эритроциты лизировали раствором на основе хлорида аммония (PharmLyse, Becton Dickinson, США) в течение 10 мин и анализировали на проточном цитометре.

Гейтирование CD34⁺-клеток выполняли в соответствии с рекомендациями ISHAGE [17] с небольшими модификациями [18]. К указанной стратегии гейтирования добавлены дополнительные этапы для определения экспрессии антигенов CD38, HLA-DR и CD143 на CD34⁺-клетках. Анализировали следующие субпо-

пуляции CD34⁺-клеток: CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} (длительно репопулирующие клетки), CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ (ранние стволовые клетки), CD34⁺CD143⁺ (СКК, экспрессирующие АПФ). Исследование выполняли не позднее 3 ч после забора биоматериала.

Статистическая обработка данных

Для анализа результатов использовали классические методы описательной статистики, частотный и регрессионный анализы. Многофакторный ковариационный анализ использовали для отбора наиболее значимых признаков (SAS, процедура GLMSELECT). Изучение динамики исследуемых лабораторных измерений проводили с помощью методов анализа повторных наблюдений в общей линейной модели (SAS, процедура MIXED).

Результаты

Для определения факторов, ассоциированных с количеством CD34⁺-клеток, собранных в 1-м ЛК, на 1-м этапе проведен пошаговый отбор признаков в многофакторной ковариационной модели. Среди клинических параметров были выбраны: возраст пациента, число проведенных курсов ХТ до мобилизации, фаза заболевания на момент начала мобилизации, наличие инфекционных осложнений в период мобилизации. Кроме того, исследовали такие факторы, как количество клеток CD34⁺CD143⁺, CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}, CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ в ПК до мобилизации. Поскольку распределение числового признака субпопуляций CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-} и CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻ сильно отклонялось от нормального и находилось на грани чувствительности метода, для их анализа использовали бинарный признак (≥ 0). При оценке факторов, ассоциированных с количеством CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻-клеток в 1-м ЛК, использовали аппарат общей линейной модели и для этого нормализовали распределение параметров, переходя от исходных значений к логарифмическим.

На 2-м этапе в парной модели проводили проверку признаков, отображенных в многофакторной

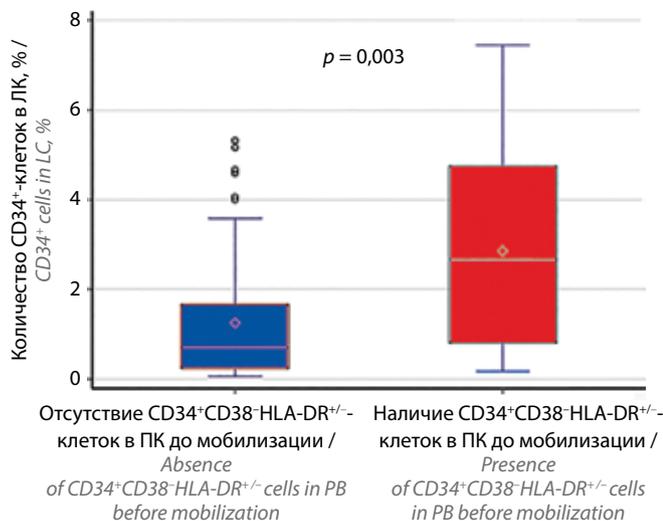


Рис. 1. Количество $CD34^+$ -клеток в 1-м лейкоконцентрате (ЛК) и $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в периферической крови (ПК) до мобилизации

Fig. 1. $CD34^+$ cells in the first leukocyte concentrate (LC) and $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ cells in the peripheral blood (PB) before mobilization

ковариационной модели. Факторы, не показавшие статистически значимых различий на этапе многофакторного сравнения, в парной модели не оценивались.

Факторы, ассоциированные с количеством собранных $CD34^+$ -клеток в первом лейкоконцентрате

В многофакторной ковариационной модели статистически значимыми факторами, ассоциированными с высоким количеством $CD34^+$ -клеток в ЛК, оказались: присутствие $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в ПК до мобилизации ($R^2 = 0,11$; $p = 0,034$), количество $CD34^+CD143^+$ -клеток в ПК до мобилизации ($R^2 = 0,16$; $p = 0,0033$).

Проверка отобранных признаков в парной модели подтвердила связь присутствия длительно репопулирующих клеток-предшественниц с иммунофенотипом $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ в ПК до мобилизации с большим количеством $CD34^+$ -клеток в 1-м ЛК ($p = 0,003$). При наличии $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в ПК до мобилизации медиана количества $CD34^+$ -клеток в 1-м ЛК составила 2,6 %, а при их отсутствии – 0,71 % (рис. 1).

Для оценки связи количества $CD34^+CD143^+$ -клеток в ПК до мобилизации с количеством $CD34^+$ -клеток в 1-м ЛК построена регрессивная модель, показавшая пограничное значение статистической значимости ($p = 0,05$). Такой результат свидетельствует, что связь есть, но выражена слабо. Вероятно, необходимо продолжить исследование для проверки описанного феномена.

Факторы, ассоциированные с количеством $CD34^+CD143^+$ -клеток в первом лейкоконцентрате

Для дальнейшего попарного однофакторного анализа выделены следующие параметры: диагноз паци-

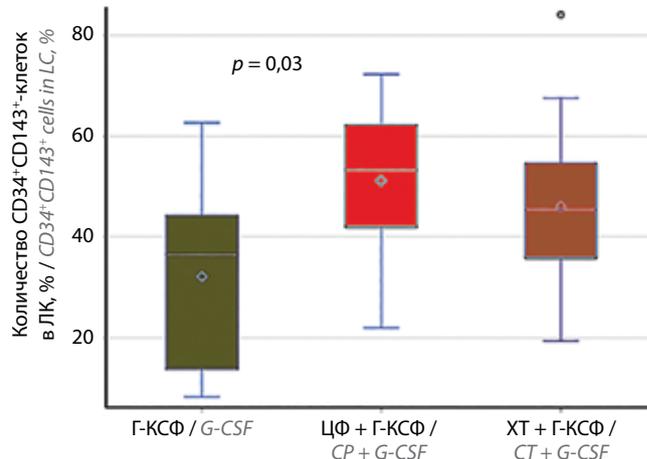


Рис. 2. Количество $CD34^+CD143^+$ -клеток в 1-м лейкоконцентрате (ЛК) в зависимости от режима мобилизации: Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ЦФ – циклофосфамид; ХТ – химиотерапия

Fig. 2. $CD34^+CD143^+$ cells in the first leukocyte concentrate (LC) depending on the mobilization type: G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; CP – cyclophosphamide; CT – chemotherapy

ента ($R^2 = 0,43$; $p = 0,0011$), режим мобилизации ($R^2 = 0,48$; $p = 0,027$) и число курсов ХТ ($R^2 = 0,54$; $p = 0,021$).

Результаты попарного однофакторного анализа показали статистически значимые различия в количестве $CD34^+CD143^+$ -клеток в 1-м ЛК в зависимости от схемы мобилизации. При использовании Г-КСФ в монорежиме количество $CD34^+CD143^+$ -клеток в 1-м ЛК было значимо меньше, чем при использовании режимов с ХТ и Г-КСФ ($p = 0,03$). Однако важно отметить, что большинство (9 из 16) пациентов группы Г-КСФ в монорежиме имели почечную недостаточность, что может свидетельствовать о ложной корреляции, вызванной другой связью (рис. 2).

При парном анализе связь количества $CD34^+CD143^+$ -клеток в 1-м ЛК с диагнозом и числом курсов ХТ не подтвердилась ($p = 0,28$ и $p = 0,15$ соответственно).

Факторы, ассоциированные количеством $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ (длительно репопулирующих) клеток в первом лейкоконцентрате

При многофакторном ковариационном анализе выделены следующие факторы, ассоциированные с количеством $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в 1-м ЛК: диагноз ($R^2 = 0,35$; $p = 0,008$), количество $CD34^+CD143^+$ -клеток в ПК до мобилизации ($R^2 = 0,08$; $p = 0,01$), наличие $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в ПК до мобилизации ($R^2 = 0,26$; $p = 0,001$), наличие $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в ПК до мобилизации ($R^2 = 0,14$; $p = 0,02$). Однако при попарном анализе ни один из этих факторов не показал статистически значимых различий.

Факторы, ассоциированные с количеством $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток (ранних стволовых кроветворных клеток) в первом лейкоконцентрате

В предварительном многофакторном ковариационном анализе установлено, что количество

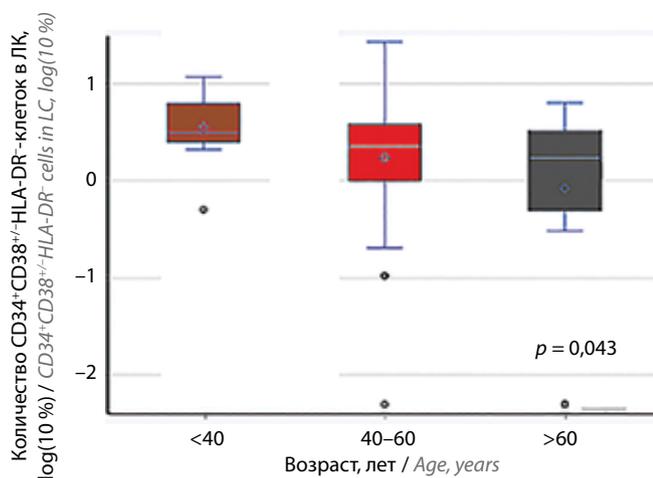


Рис. 3. Количество $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м лейкоконцентрате (ЛК) в зависимости от возраста пациентов
Fig. 3. $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ cells in the first leukocyte concentrate (LC) depending on the patient age

$CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м ЛК зависело от возраста ($R^2 = 0,15$; $p = 0,03$) и инфекционных осложнений в период мобилизации СКК ($R^2 = 0,07$; $p = 0,02$).

При анализе попарной связи отобранных признаков и $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м ЛК оба фактора оказались статистически значимыми. У пациентов >60 лет количество $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м ЛК было меньше, чем у пациентов <60 лет ($p = 0,043$). Медиана значений у пациентов <40 лет составила 0,48 %, у пациентов 40–60 лет – 0,36 %, у пациентов >60 лет – 0,23 % (рис. 3). При наличии инфекционных осложнений на этапе мобилизации СКК количество $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м ЛК было меньше, чем у пациентов без инфекционных осложнений ($p = 0,019$; медиана 0,38 % против 0,52 % соответственно) (рис. 4).

Обсуждение

Прогноз эффективности сбора $CD34^+$ -клеток остается актуальным в связи с отсутствием адекватного восстановления кроветворения у ряда пациентов после ауто-ТГСК. В ряде случаев трансплантация достаточного количества $CD34^+$ -клеток ($\geq 2 \times 10^6$ /кг массы тела пациента) не приводит к полноценному трехростковому восстановлению кроветворения [6]. После восстановления гемопоэза могут отмечаться повторные отсроченные цитопении, приводящие к серьезным инфекционным осложнениям. У ряда пациентов наблюдается быстрое восстановление лейкоцитов ПК в ранний период после трансплантации, которое в последующем сменяется падением и повторной медленной реконституцией. Пролонгированная тромбоцитопения встречается у 37 % пациентов после ТГСК и связана с неблагоприятным прогнозом и повышенным риском кровотечения [19]. Мы предположили, что это может быть связано с клеточным составом трансплантата, и определенные субпопуляции $CD34^+$ -клеток

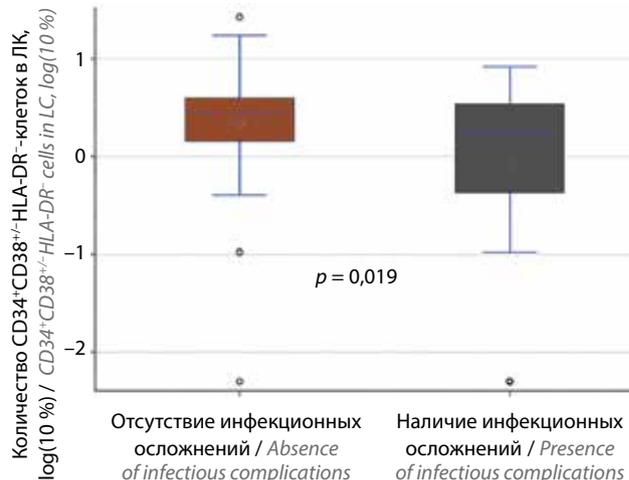


Рис. 4. Количество $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ -клеток в 1-м лейкоконцентрате (ЛК) в зависимости от наличия инфекционных осложнений на этапе мобилизации
Fig. 4. $CD34^+CD38^{+/-}HLA-DR^-$ cells in the first leukocyte concentrate (LC) depending on the presence of infectious complications during mobilization

могут выступать предикторами неэффективного восстановления кроветворения после трансплантации.

Хотя данные исследования N. H. Collins и соавт. не показали связи между минорными субпопуляциями $CD34^+$ в ЛК и реконституцией гемопоэза после трансплантации [20], мы сосредоточили внимание на биологически значимых группах клеток, не рассмотренных ранее в отечественных и зарубежных исследованиях. В предыдущей работе мы охарактеризовали количество различных субпопуляций $CD34^+$ в ПК на разных этапах мобилизации и в 1-м ЛК [15]. В данной статье мы сумели выделить факторы, которые ассоциированы с количеством этих популяций в 1-м ЛК.

Существует ряд факторов, влияющих на мобилизацию клеток и субпопуляционный состав СКК при ауто-ТГСК у пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы. Принципиально эти факторы можно разделить на 2 группы: связанные с предшествующим лечением (многочисленные курсы ХТ, предшествовавшие трансплантации, ответ на терапию до ауто-ТГСК, режим мобилизации, наличие инфекционных осложнений на этапе мобилизации) и связанные с пациентом и особенностями заболевания (возраст, диагноз, поражение костного мозга опухолью). Мы также дополнительно оценили, будет ли влиять субпопуляционный состав компартмента $CD34^+$ в ПК на количество субпопуляций $CD34^+$ с разным иммунофенотипическим профилем в 1-м ЛК.

В нашем исследовании наличие $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клеток в ПК было положительно связано с количеством $CD34^+$ -клеток в трансплантате. Доказано, что $CD34^+CD38^-HLA-DR^{+/-}$ -клетки имеют наибольший потенциал пролиферации [11]. Вероятно, они будут обеспечивать полноценную реконституцию пула $CD34^+$ -клеток в трансплантате.

В настоящее время продолжается изучение связи АПФ (антиген CD143) с пролиферативной активностью клеток костного мозга. АПФ обнаруживается на поверхности клеток-предшественниц эмбрионального и постэмбрионального кроветворения [21]. В прошлой работе мы установили, что количество CD143⁺-клеток увеличивается в ПК после мобилизации, что указывает на участие АПФ в пролиферации СКК [15].

Показано, что комбинированное воздействие ХТ и Г-КСФ вызывает более эффективную мобилизацию СКК [22, 23]. Еще одно возможное преимущество такого подхода – улучшение качественного состава трансплантата за счет предполагаемого уменьшения опухолевой массы или эрадикации опухолевого клона с помощью химиопрепаратов, используемых в протоколе мобилизации. Мы выявили взаимосвязь между количеством CD34⁺CD143⁺-клеток в 1-м ЛК и режимом мобилизации. При использовании Г-КСФ в монорежиме количество CD34⁺CD143⁺-клеток было меньше, чем при использовании Г-КСФ + ХТ, но, по данным F. De Voeg и соавт., меньший выход СКК дает режим Г-КСФ + ХТ, что противоречит нашим результатам. Вероятнее всего, различия в полученных результатах обусловлены различиями в составе групп пациентов: в исследование F. De Voeg и соавт. включены пациенты, страдающие раком молочной железы

(группа Г-КСФ + циклофосфамид) и множественной миеломой (группа Г-КСФ + ХТ) [24].

Заключение

Таким образом, показано, что количество CD34⁺-клеток в 1-м ЛК связано с количеством в ПК CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}-клеток, т.е. клеток ранней стадии дифференцировки с высоким потенциалом к репопуляции. При этом факторов, ассоциированных с количеством CD34⁺CD38⁻HLA-DR^{+/-}-клеток (СКК с высокой репопулирующей способностью) в 1-м ЛК, не обнаружено. Количество в 1-м ЛК CD34⁺CD38^{+/-}HLA-DR⁻-клеток (ранних СКК) ассоциировано с возрастом пациента и наличием инфекционных осложнений в момент начала мобилизации, что, возможно, связано со сниженной способностью костного мозга образовывать СКК с увеличением возраста или при наличии инфекции.

Учитывая связь АПФ с пролиферативной активностью костного мозга, мы исследовали зависимость между субпопуляцией клеток CD34⁺CD143⁺ и количеством СКК. Регрессивная модель анализа данных показала пограничное значение связи количества CD34⁺CD143⁺-клеток в ПК до мобилизации и CD34⁺-клеток в 1-м ЛК ($p = 0,05$). Вероятно, необходимо продолжить исследование для проверки указанного феномена.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Зубаровская Л.С., Фрегатова Л.М., Афанасьев Б.В. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при гемобластозах. Клиническая онкогематология. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2007. С. 912.
Zubarovskaya L.S., Fregatova L.M., Afanasiev B.V. Transplantation of hematopoietic stem cells in hemoblastoses. Clinical oncohematology. Ed.: M.A. Volkova. Moscow: Meditsina, 2007. P. 912. (In Russ.).
2. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С. Роль трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в терапии взрослых больных острыми лейкозами. Онкогематология 2006;(1-2):70–85. DOI: 10.17650/1818-8346-2006-0-1-2-70-85
Afanasiev B.V., Zubarovskaya L.S. Role of hemopoietic stem cell transplantation in therapy of adult patients with acute leukemias. Onkogematologiya = Oncohematology 2006;(1-2):70–85. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2006-0-1-2-70-85
3. Feugier P., Bensoussan D., Girard F. et al. Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34⁺ cells. Transfusion 2003;43(7):878–84. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.00446.x
4. Mavroudis D., Read E., Cottler-Fox M. et al. CD34⁺ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. Blood 1996;88(8):3223–9.
5. Sorasio R., Bonferroni M., Grasso M. et al. Peripheral blood CD34⁺ percentage at hematological recovery after chemotherapy is a good early predictor of harvest: a single-center experience. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(5):717–23. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.02.002
6. Giralt S., Costa L., Schriber J. et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20(3):295–308. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.10.013
7. Андреева Л.Ю., Тупицын Н.Н. Субпопуляции периферических стволовых гемопоэтических клеток (ПСГК). Проточно-цитофлуориметрическая идентификация ПСГК на основании светорассеяния и экспрессии CD34, CD45, AC133. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2002;1(1):60–5.
Andreeva L.Yu., Tupitsyn N.N. Subpopulations of peripheral hematopoietic stem cells (PHSC). Identification of PHSC based on light scattering, expression of CD34, CD45, AC133 by flow cytometry. Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2002;1(1):60–5. (In Russ.).
8. Sakabe H., Ohmizono Y., Tanimukai S. et al. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. Stem Cells 1997;15(1):73–81. DOI: 10.1002/stem.150073
9. Wisniewski D., Affer M., Willshire J., Clarkson B. Further phenotypic characterization of the primitive lineage—CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻ hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral

- blood and patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood Cancer J* 2011;1(9):e36. DOI: 10.1038/bcj.2011.35
10. Terstappen L.W., Huang S., Safford M. et al. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺CD38⁻ progenitor cells. *Blood* 1991;77(6):1218–27.
 11. Rusten L.S., Jacobsen S.E., Kaalhus O. et al. Functional differences between CD38⁻ and DR⁻ subfractions of CD34⁺ bone marrow cells. *Blood* 1994;84(5):1473–81. DOI: 10.1182/blood.V84.5.1473.1473
 12. Haznedaroglu I.C., Tuncer S., Gursoy M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. *Medical Hypotheses* 1996;46(6):507–10. DOI: 10.1016/S0306-9877(96)90122-X
 13. Чеснокова Н.Б., Никольская И.И., Мухаметова Л.И. и др. Компоненты фибринолитической и ренин-ангиотензиновой систем в тканевых структурах и жидких средах глаза кроликов в норме и после ожога роговицы. *Российский офтальмологический журнал* 2008;1(2):46–50. Chesnokova N.B., Nikolskaya I.I., Mukhametova L.I. et al. Components of the fibrinolytic and renin-angiotensin systems in tissue structures and liquid environments of the rabbit eye under normal conditions and after corneal burns. *Rossiyskiy oftalmologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal* 2008;1(2):46–50. (In Russ.).
 14. Abali H., Haznedaroglu I.C., Goker H. et al. Circulating and local bone marrow renin-angiotensin system in leukemic hematopoiesis: preliminary evidences. *Hematology* 2002;7(2):75–82. DOI: 10.1080/10245330290022160
 15. Канаева М.Л., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. и др. Особенности субпопуляционного состава мобилизованных стволовых кроветворных клеток у больных с опухолями кроветворной системы и доноров: экспрессия антигенов CD38, HLA-DR и CD143. *Онкогематология* 2019;14(2):48–58. DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-2-48-58 Kanaeva M.L., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. et al. Subpopulations of mobilized hematopoietic stem cells in patients with hematological malignancies and donors: expression of CD38, HLA-DR and CD143. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2019;14(2):48–58. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-2-48-58
 16. Barnett D., Janossy G., Lubenko A. et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34⁺ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol* 1999;21(5):301–8. DOI: 10.1046/j.1365-2257.1999.00253.x
 17. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M. et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5(3):213–26. DOI: 10.1089/scd.1.1996.5.213
 18. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика, 2018. С. 1031–1040. Diagnostic algorithms and treatment protocols for diseases of the blood system. Ed.: V.G. Savchenko. Moscow: Praktika, 2018. Pp. 1031–1040. (In Russ.).
 19. Yamazaki R., Kuwana M., Mori T. et al. Prolonged thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: associations with impaired platelet production and increased platelet turnover. *Bone Marrow Transplant* 2006;38(5):377–84. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705444
 20. Collins N.H., Gee A.P., Duret A.G. et al. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(2):253–62. DOI: 10.1016/j.bbmt.2009.10.004
 21. Zambidis E.T., Park T.S., Yu W. et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008;112(9):3601–14. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144766
 22. Ameen R.M., Alshemmari S.H., Alqallaf D. Factors associated with successful mobilization of progenitor hematopoietic stem cells among patients with lymphoid malignancies. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008;8(2):106–10. DOI: 10.3816/CLM.2008.n.012
 23. Meldgaard Knudsen L., Jensen L., Gaardsdal E. et al. A comparative study of sequential priming and mobilisation of progenitor cells with rhG-CSF alone and high-dose cyclophosphamide plus rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(7):717–22. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702609
 24. De Boer F., Dräger A.M., Van Haperen M.J. et al. The phenotypic profile of CD34-positive peripheral blood stem cells in different mobilization regimens. *Br J Haematol* 2000;111(4):1138–44. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02438.x

Вклад авторов

И.В. Гальцева, Л.П. Менделеева, К.А. Никифорова, Л.А. Кузьмина, Я.К. Мангасарова, В.В. Троицкая, Т.В. Гапонова, Е.Н. Паровичникова: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи;

М.Л. Канаева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ данных, написание текста статьи;

С.М. Куликов: статистическая обработка данных.

Authors' contributions

I.V. Galtseva, L.P. Mendeleeva, K.A. Nikiforova, L.A. Kuzmina, Ya.K. Mangasarova, V.V. Troitskaya, T.V. Gaponova, E.N. Parovichnikova: research design development, data analysis, article writing;

M.L. Kanaeva, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov: research design development, obtaining data for analysis, data analysis, article writing;

S.M. Kulikov: statistical analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.В. Гальцева / I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>

Л.П. Менделеева / L.P. Mendeleeva: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>

М.Л. Канаева / M.L. Kanaeva: <https://orcid.org/0000-0001-6840-6152>

К.А. Никифорова / K.A. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Ю.О. Давыдова / Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

Н.М. Капранов / N.M. Kapranov: <https://orcid.org/0000-0002-6512-910X>

С.М. Куликов / S.M. Kulikov: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

Л.А. Кузьмина / L.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>

Я.К. Мангасарова / Ya.K. Mangasarova: <https://orcid.org/0000-0003-1936-5934>

В.В. Троицкая / V.V. Troitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4827-8947>
Т.В. Гапонова / T.V. Gaponova: <https://orcid.org/0000-0002-9684-5045>
Е.Н. Паровичникова / E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.