

Экспрессия CXCR4 и эффективность мобилизации CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток

А.В. Куртова¹, М.А. Эстрина², С.М. Алексеев², С.А. Трофимова³,
О.А. Тупицына³, В.Г. Карпов⁴, А.Е. Здоров⁴, Б.В. Афанасьев², Е.Е. Зуева¹

¹ Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики,

Центр Лабораторной Диагностики, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

² Клиника трансплантации костного мозга, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

³ Отделение переливания крови, Городская больница № 31, Санкт-Петербург

⁴ Отделение гематологии, Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск

CXCR4 expression and CD34⁺ hematopoietic stem cells mobilization efficacy

A.V. Kurtova¹, M.A. Estrina², S.M. Alexeev², S.A. Trofimova³,
O.A. Tupitzina³, V.G. Karpov⁴, A.E. Zdorov⁴, B.V. Afanasiev², Ye.E. Zueva¹

¹ Laboratory of Clinical Immunology and Molecular Diagnostics,

Center for Laboratory Diagnostics, Pavlov State Medical University, St.-Petersburg

² Bone Marrow Transplantation Center, Pavlov State Medical University, St.-Petersburg

³ Department of Blood Transfusion, General Hospital №31, St.-Petersburg

⁴ Department of Hematology, V.A. Baranov Republic Hospital, Petrozavodsk

CXCR4 является хемокиновым рецептором, который играет ключевую роль в регуляции процессов направленной миграции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). CXCR4 представляет собой непрямую мишень для действия Г-КСФ. Целью данной работы было проведение сравнительного анализа экспрессии CXCR4 на поверхности CD34⁺ ГСК, полученных из продукта афереза мобилизованной периферической крови пациентов с различной эффективностью мобилизации. В качестве групп сопоставления в исследование включены также образцы праймированного костного мозга, нормального костного мозга и пуповинной крови. Было выявлено, что средняя интенсивность флуоресценции CXCR4, отражающая плотность экспрессии данного рецептора, снижается при стимуляции Г-КСФ в направлении: нормальный костный мозг > праймированный костный мозг > продукт афереза от мобилизуемых пациентов и негативно коррелирует с успешностью мобилизации. Уровень экспрессии CXCR4 в группе немобилизуемых пациентов не отличается от нативных источников (костный мозг, пуповинная кровь), что указывает на внутреннюю резистентность к действию Г-КСФ или иную кинетику мобилизации у пациентов с плохим ответом на мобилизацию.

Ключевые слова: CXCR4, гемопоэтические стволовые клетки, мобилизация.

Введение

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) периферической крови успешно используют для аутогенных трансплантаций у пациентов с различными онкологическими и онкогематологическими заболеваниями в связи с более быстрым приживлением и менее травматичной процедурой сбора по сравнению с костным мозгом. Физиологические основы поддержания ГСК в костномозговом микроокружении и их мобилизации в периферическую кровь представляют значительный клинический интерес. ГСК, полученные в ходе мобилизации, активно используют в современной трансплантологии: среди 30 000 проводимых ежегодно в мире аутогенных трансплантаций ГСК в 95% случаев используют гемопоэтические предшественники, полученные в ходе

CXCR4 is a chemokine receptor which is essential for targeted migration of hematopoietic stem cells (HSC). CXCR4 is known to be an indirect target for G-CSF stimulation. The aim of this study was to evaluate the level of CXCR4 expression on the surface of HSC, collected from apheresis products of patients with different responses to G-CSF-stimulation. Cord blood, normal bone marrow and primed bone marrow samples were analyzed to be compared with apheresis product. It was demonstrated that mean fluorescence intensity of CXCR4 indicating the density of CXCR4 expression on HSC surface is diminished after G-CSF stimulation towards normal bone marrow ? primed bone marrow ? apheresis product from mobilizable patients and demonstrates negative correlation with mobilization efficacy. CXCR4 expression on the surface of HSC from non-mobilizable patients does not differ from other native sources, such as normal bone marrow and cord blood, that points out the intrinsic unresponsiveness to G-CSF treatment or other kinetics of mobilization in poor-mobilizable patients.

Key words: CXCR4, CD34⁺ hematopoietic stem cells, mobilization.

мобилизации и последующего афереза [1], среди 15 000 аллогенных трансплантаций, проведенных в Европе, 70% ассоциированы с использованием мобилизованной периферической крови [2]. Для минимизации риска развития реакции «трансплантат против хозяина» в качестве альтернативных источников ГСК для трансплантаций рассматривают также праймированный костный мозг [3] и пуповинную кровь [4].

Количество трансплантированных ГСК на килограмм массы тела пациента имеет принципиальное значение для успешного восстановления гемопоэза: 2×10⁶ CD34⁺ ГСК/кг считают минимально необходимой дозой для достижения положительного эффекта от трансплантации, хотя доза 5×10⁶ CD34⁺ ГСК/кг и более является предпочтительной.

Адрес для корреспонденции:

197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого 6–8, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики, Центр лабораторной диагностики,

Телефон: (812)–234–34–07, Факс: (812)–233–97–26; E-mail: antonina.kurtova@gmail.com

Несмотря на значительные усилия по оптимизации протоколов мобилизации, 20–46% пациентов оказываются практически резистентными к действию мобилизующих агентов [5], что делает чрезвычайно востребованным более детальное исследование процессов мобилизации у пациентов онкологического и онкогематологического профиля.

Взаимодействие хемокинового рецептора CXCR4 с его нативным лигандом stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) играет принципиальную роль в обеспечении контактов ГСК с костномозговым стромальным микроокружением. Результатом взаимодействия CXCR4 с SDF-1 является модификация таких процессов, как

- транскрипция генов, вовлеченных в регуляцию апоптоза,
- клеточная адгезия,
- клеточная миграция.

Мобилизация ГСК может происходить с различной интенсивностью в ответ на определенные стимулы, такие как значительная физическая нагрузка, воспаление, проведение миелосупрессивной химиотерапии, а также при повышении концентрации определенных гемопоэтических ростовых факторов, цитокинов, и полианионов [6]. Практически все эти стимулы прямо или косвенно затрагивают взаимодействие CXCR4–SDF-1 для обеспечения мобилизации ГСК, что указывает на его важную роль в процессах регуляции миграционной активности гемопоэтических предшественников.

Препараты гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) являются наиболее часто используемыми в клинической практике мобилизующими агентами. В целом, Г-КСФ-индуцированная мобилизация со сроком стимуляции около 5 дней представляет собой двухэтапный процесс. Первый этап характеризуется активацией клеток гранулоцитарного ряда различной степени зрелости и формированием в костном мозге протеолитического микроокружения за счет повышения концентрации таких ферментов как эластаза нейтрофилов, катепсин G, протеиназа 3 и др. Второй сопряжен с разрушением контактов ГСК с компонентами костномозгового микроокружения, в том числе CXCR4–SDF-1, и выходом ГСК в периферический кровоток [7]. Аналогичный эффект имеет место и при праймировании, когда в ходе краткосрочной стимуляции препаратами Г-КСФ также происходит активация клеток гранулоцитарного звена, что опосредованно способствует разрушению контактов ГСК с костномозговым микроокружением.

Целью данной работы было проведение сравнительного анализа экспрессии CXCR4 на поверхности CD34⁺ ГСК, полученных из продукта афереза мобилизованной периферической крови пациентов с различной эффективностью мобилизации. В качестве групп сопоставления в исследование включены образцы праймированного костного мозга, нормального костного мозга и пуповинной крови.

Материал и методы

Образцы аферезного продукта (n = 40) были получены от 20 пациентов при планировании аутогенной трансплантации (n=23) в результате процедуры лейкоафереза на клеточном фракционаторе крови COBE Spectra (version 7.0, Gambro, Sweden) после мобилизации выхода ГСК путем введения Г-КСФ («Граноцит», Aventis, France, «Нейпоген 48», Roche, Switzerland) из расчета 5–10,5 мкг/кг массы тела пациента в течение 4–17 дней. Все пациенты получали предшествующую химиотерапию. У 11 пациентов были проанализированы образцы от первого и второго дня афереза. Характеристики пациентов представлены в табл. 1, стратегий мобилизации – в табл. 2.

Образцы праймированного (n = 6) костного мозга были получены от здоровых доноров при планировании аллогенной трансплантации после проведения праймирования путем введения Г-КСФ («Граноцит», Aventis, France, «Нейпоген 48», Roche, Switzerland) из расчета 5–10 мкг/кг массы тела донора в течение 2–5 дней.

Образцы пуповинной крови (n = 12) были получены после нормальных срочных родов до отхождения плаценты.

Таблица 1. Характеристика пациентов

Параметры	Пациенты
Общее количество	20
Количество циклов мобилизации	23
Пол (М/Ж)	8/12
Возраст, лет;	33,5
Медиана (min-max)	(12–55)
Диагноз:	
Лимфома Ходжкина (ЛХ)	7
Неходжкинская лимфома (НХЛ)	3
Множественная миелома (ММ)	3
Острый немиелобластный лейкоз (ОНЛ)	3
Саркома Юинга (СЮ)	2
Синовиальная саркома (СС)	1
Рак молочной железы (РМЖ)	1
Статус заболевания на момент мобилизации:	
Полная ремиссия 1	3
Полная ремиссия 2	1
Частичная ремиссия	8
Рецидив	8
Количество курсов предшествующей химиотерапии:	
>5 курсов	9
≤5 курсов	11

Таблица 2. Характеристика циклов мобилизации

Количество циклов мобилизации	23
Количество процедур афереза	40
Количество аферезов за цикл, Медиана (min-max)	2 (1–4)
Схема мобилизации (по циклам):	
Химиотерапия + Г-КСФ	11
Циклофосфан + Г-КСФ	6
Г-КСФ	6
Длительность стимуляции Г-КСФ, дней Медиана (min-max)	5 (4–17)
Количество CD34 ⁺ ГСК ×10 ⁶ /кг Медиана (min-max)	2,57 (0,04–54,00)
Успешность циклов мобилизации:	
Пациенты	
Немобилизуемые (<2×10 ⁶ /кг CD34 ⁺ ГСК)	9
Мобилизуемые (2≤N<5×10 ⁶ /кг CD34 ⁺ ГСК)	8
Отлично мобилизуемые (≥5×10 ⁶ /кг CD34 ⁺ ГСК)	6

Образцы нормального ($n = 5$) костного мозга были получены от пациентов негематологического профиля при планировании проведения клеточной регенерационной терапии в форме аутогенной трансплантации ГСК.

Подготовка проб всех биологических материалов для выявления $CD34^+$ ГСК и оценки уровня экспрессии CXCR4 (CD184) была проведена без специальных процедур по обогащению гемопоэтическими предшественниками по методике «окрашивание–лизис–без отмывки».

Клетки (не менее $2-3 \times 10^6$ /мл) были инкубированы при $+4^\circ\text{C}$ в темноте в течение 30 минут со следующими моноклональными антителами: CD45–FITC, CD14–PE, CD34–PE, CD184–PerCP–Cy5.5 и соответствующими изотипическими контролями (все – Vecton Dickinson, San Jose, CA, USA). Для лизирования эритроцитов после инкубации с антителами был использован рабочий раствор EasyLyse (DakoCytomation, Denmark) согласно рекомендациям производителя.

Оценка антигенной экспрессии была проведена на точном цитометре PartecPAS (Partec, Germany), оснащенный одним аргоновым лазером (мощность 15 mW, испускаемая длина волны 488 нм), с использованием программного обеспечения FloMax.

В соответствии с рекомендациями ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) по количественному учету $CD34^+$ ГСК было проанализировано не менее 100 000 событий и не менее 100 клеток с фенотипом $CD34^+CD45^{\text{dim}}SSC^{\text{low}}$ [8].

Оценку экспрессии CD184 проводили на целевой популяции ГСК путем создания последовательных логических ограничений (гейтов):

- количественно – в виде процентного выражения содержания $CD184^+$ клеток среди всех ГСК;
- качественно – в виде оценки средней интенсивности флуоресценции – mean fluorescence intensity (MFI) – CD184.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Описательная статистика представлена в виде медианы (median), минимального и максимального значения (min–max). Для сравнения зависимых вариантов (парные наблюдения) был использован непараметрический критерий Уилкоксона. Для сравнения параметров в независимых группах был использован критерий Манна–Уитни. Для выявления корреляционной зависимости был использован ранговый тест Спирмена. Различия выборки считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В исследование включены данные по 23 циклам мобилизации для 20 пациентов. Для трех пациентов, не ответивших на первую мобилизацию, была предпринята вторая попытка (ж/РМЖ, м/ОНЛ, м/ОНЛ) стимуляции выхода гемопоэтических предшественников введением Г–КСФ. Характеристика клинических данных пациентов представлена в табл. 1.

По схемам мобилизации все циклы были разделены на три варианта: химиотерапия + Г–КСФ, циклофосфан + Г–КСФ, только Г–КСФ. Успех мобилизации был оценен по количеству $CD34^+$ ГСК/кг массы тела пациента и, в соответствии с классификацией Stiff [9], на основе этих данных были выделены три группы пациентов:

1. Немобилизуемые пациенты, для которых в ходе последовательных аферезов не удалось получить больше 1×10^6 $CD34^+$ ГСК/кг.

2. Мобилизуемые пациенты, для которых в ходе последовательных аферезов удалось получить минимально необходимую дозу для одной трансплантации, но не удалось достичь оптимальной дозы 5×10^6 $CD34^+$ ГСК/кг.

3. Отлично мобилизуемые пациенты, для которых удалось получить 5×10^6 $CD34^+$ ГСК/кг менее чем за 5 процедур афереза.

В табл. 2 представлены характеристики циклов мобилизации для 20 пациентов, включенных в исследование.

Оценка экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК в образцах аферезного продукта была проведена отдельно для каждой группы пациентов. В случае проведения афереза в течение двух дней подряд в качестве конечного показателя интенсивности флуоресценции было использовано среднее арифметическое от данных по первому и второму дню афереза. Для сравнения выборок был использован критерий Манна–Уитни.

Результаты качественной и количественной оценки экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК из различных источников представлены в табл. 3.

При сравнении выборок по количественной экспрессии CXCR4 достоверные различия ($p < 0,03$) были получены только между образцами пуповинной крови и аферезного продукта от отлично мобилизуемых пациентов. При сопоставлении данных по средней интенсивности флуоресценции CXCR4 были дополнительно верифицированы значимые различия между группами (см. табл. 3). Было выявлено, что в образцах праймированного костного мозга средняя интенсивность флуоресценции CXCR4 достоверно отличается от таковой в образцах нормального костного мозга и пуповинной крови ($p < 0,019$ и $p < 0,024$ соответственно).

Таблица 3. Экспрессия CXCR4 на поверхности ГСК

Параметр	Продукт афереза			Костный мозг, праймирование	Костный мозг, без стимуляции	Пуповинная кровь
	Отлично мобилизуемые пациенты	Мобилизуемые пациенты	Немобилизуемые пациенты			
CXCR4 ⁺ ГСК, % от всех ГСК Медиана (min-max)	73,15 (42,72–88,65) ^{a-} $p=0,228$	80,66 (32,90–96,61) ^{a-} $p=0,694$	86,73 (22,35–100,00)	89,66 (59,95–97,79) ^{a-} $p=1,050$	88,32 (83,86–100,00) ^{a-} $p=0,461$	92,12 (67,05–100,00) ^{a-} $p=0,792$
MFI CXCR4 Медиана (min-max)	1,56 (1,01–1,59) ^{a-} $p < 0,0007$	1,83 (0,81–7,77) ^{a-} $p < 0,009$	6,82 (3,74–13,54)	2,40 (1,48–2,71) ^{a-} $p < 0,0007$	3,95 (2,47–17,35) ^{a-} $p=0,368$	4,11 (1,52–12,38) ^{a-} $p=0,343$

^{a-} уровень значимости различий по сравнению с группой немобилизуемых пациентов. Синим цветом отмечены группы с наиболее высоким уровнем MFI CXCR4.

На рис. 1 представлено соотношение медиан MFI CXCR4 на поверхности ГСК в исследуемых группах.

На рис. 3. представлены дот-плоты, отражающие результаты количественного и качественного анализа экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК из различных источников. Логические ограничения для идентификации гемопоэтических предшественников созданы согласно протоколу количественного учета ГСК ISHAGE.

Медиана количества $CD34^+$ ГСК/мкл конечного суммарного аферезного продукта составила 94,5 (8,4–1894,7). Значимая отрицательная корреляция была выявлена между интенсивностью флуоресценции CXCR4 и количеством $CD34^+$ ГСК/мкл аферезного продукта ($r = -0,647$, $p < 0,003$). Графическая иллюстрация представлена на рис. 2.

Зависимость эффективности мобилизации от режима мобилизации не была выявлена, что, возможно, связано с незначительным объемом выборки.

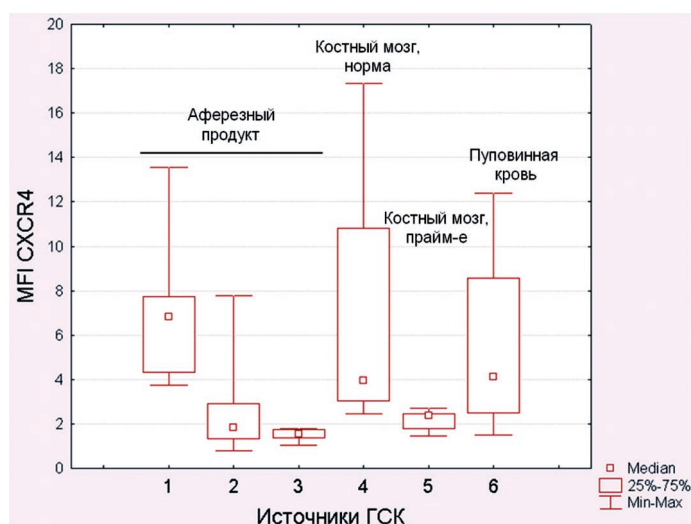


Рис. 1. Сопоставление медиан MFI CXCR4 на поверхности ГСК из различных источников:

- 1 – аферезный продукт, немобилизуемые пациенты;
- 2 – аферезный продукт, мобилизуемые пациенты;
- 3 – аферезный продукт, отлично мобилизуемые пациенты;
- 4 – нормальный костный мозг;
- 5 – праймированный костный мозг;
- 6 – пуповинная кровь

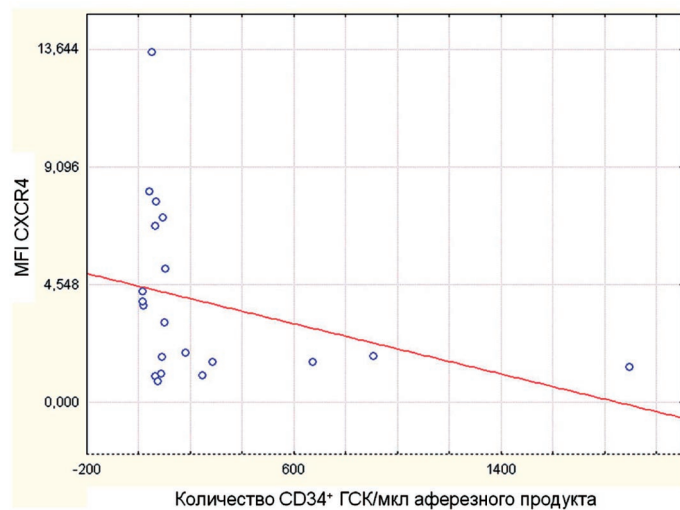


Рис. 2. Отрицательная корреляционная зависимость количества $CD34^+$ ГСК/мкл аферезного продукта и интенсивности флуоресценции CXCR4 на поверхности мобилизованных ГСК

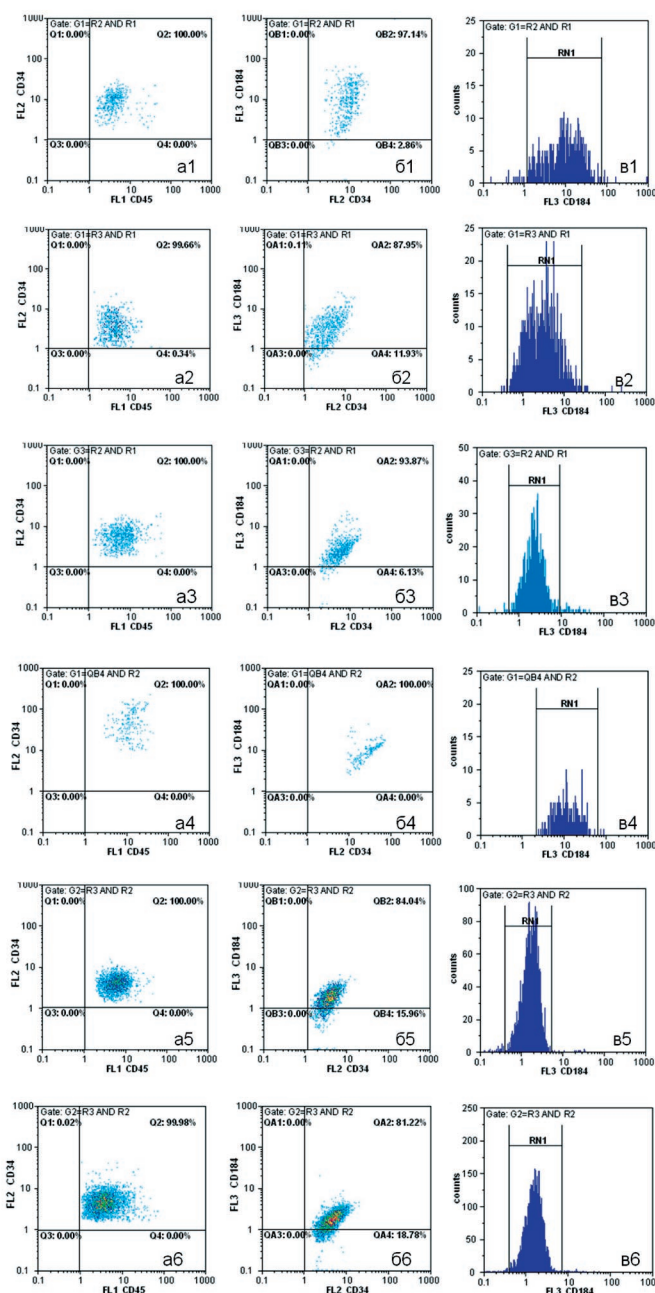


Рис. 3. Дот-плоты, представляющие данные анализа количественной и качественной экспрессии CXCR4 методом проточной цитометрии:
 а – подтверждение фенотипа ГСК $CD34^+CD45^+$ на двумерной гистограмме $CD34/CD45$;
 б – количественный анализ экспрессии CXCR4 ($CD184$) на двумерной гистограмме $CD34/CD184$;
 в – качественный анализ экспрессии CXCR4 на одномерной гистограмме $CD184$;
 1 – пуповинная кровь;
 2 – нормальный костный мозг;
 3 – праймированный костный мозг;
 4 – аферезный продукт, немобилизуемый пациент;
 5 – аферезный продукт, мобилизуемый пациент;
 6 – аферезный продукт, отлично мобилизуемый пациент

Обсуждение и выводы

В соответствии с биологическими основами процесса мобилизации, изменение концентрации CD34⁺ ГСК в периферической крови при стимуляции Г-КСФ является следствием динамических процессов, основным среди которых является миграция ГСК из костного мозга за счет изменения взаимоотношений ГСК со стромой. Направленная миграция ГСК осуществляется и в физиологических условиях в ходе эмбрионального и постнатального поддержания гемопоэза. Взаимодействие CXCR4-SDF-1 играет одну из ключевых ролей в процессах направленной миграции ГСК и чрезвычайно важно как для мобилизации, так и для хоминга гемопоэтических предшественников.

В данной работе была исследована экспрессия CXCR4 на поверхности ГСК из различных биологических источников:

- пуповинной крови – для определения уровня экспрессии CXCR4 при естественной неиндуцированной миграции ГСК;
- нормального костного мозга – для характеристики нативного уровня экспрессии CXCR4;
- праймированного костного мозга – для исследования ранних этапов изменения экспрессии CXCR4 при Г-КСФ-индуцированной мобилизации;
- продукта афереза – для изучения поздних этапов изменения экспрессии CXCR4 при Г-КСФ индуцированной мобилизации у пациентов с различным ответом на стимуляцию.

Пуповинная кровь характеризуется присутствием значительного количества циркулирующих гемопоэтических предшественников, однако, природа мобилизующего стимула до сих пор не выяснена. Учитывая биологические основы мобилизации ГСК во взрослом организме, можно предположить, что данное явление связано с усиленной продукцией Г-КСФ, SDF-1 или комплексной нейроэндокринной регуляцией поздних этапов эмбрионального гемопоэза. В данном исследовании было показано, что ГСК пуповинной крови демонстрируют вариабельный, но, высокий уровень экспрессии CXCR4, что позволяет предположить ведущую роль градиента SDF-1 в процессах направленной миграции незрелых предшественников. В пользу данной гипотезы свидетельствует быстрое время элиминации ГСК из циркулирующего кровотока после рождения, а также низкая концентрация Г-КСФ в пуповинной крови [10]. Высокий уровень MFI CXCR4 отражает значительную плотность экспрессии данного рецептора на поверхности ГСК, что может быть расценено как необходимая адаптация CD34⁺ гемопоэтических предшественников к направленной миграции в соответствии с градиентом SDF, который не ограничен костным мозгом. Полученные данные дополнительно указывают на значительную привлекательность развития практики внутрикостной трансплантации образцов пуповинной крови для минимизации экстрамедуллярных потерь ГСК.

Стабильно высокая экспрессия CXCR4 на поверхности ГСК нестимулированного костного мозга полностью соответствует данным литературы о необходимости взаимодействия CXCR4-SDF-1 для заживления ГСК в костномозговом микроокружении и для поддержания нормального гемопоэза [11]. В отличие от ГСК пуповинной крови, высокий уровень экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК в костном мозге не может быть расценен как потенциал к направленной миграции. Наоборот, он свидетельствует о высокой степени интеграции ГСК в строму костного мозга.

Праймирование в определенной степени отражает первые этапы мобилизации ГСК в периферическую кровь. Во всех исследованных образцах праймированного костного мозга была выявлена гомогенно невысокая экспрессия CXCR4. Выявленные достоверные различия по MFI CXCR4 образцов праймированного костного мозга по сравнению с образцами нормального костного мозга и аферезного

продукта от отлично мобилизуемых пациентов подтверждают промежуточный мобилизационный статус ГСК при праймировании.

Учитывая, что первый этап мобилизации в большей степени сопряжен с началом активации гранулоцитарного звена и продукцией SDF, праймированные ГСК демонстрируют относительно невысокий уровень экспрессии CXCR4. В костном мозге физиологически присутствуют зрелые нейтрофилы и коммитированные миелоидные предшественники, которые достаточно быстро реагируют на стимуляцию Г-КСФ и создаваемое при этом протеолитическое микроокружение достаточно для начальных этапов деградации адгезионных взаимодействий ГСК со стромой, что выражается в снижении интенсивности флюоресценции CXCR4. Тем не менее, этого количества активированных клеток гранулоцитарного ряда не вполне достаточно для стимуляции массивной эмиграции ГСК. Экспрессия CXCR4 на поверхности ГСК в костном мозге при стимуляции Г-КСФ не коррелирует с экспрессией CXCR4 на поверхности мобилизованных ГСК, что дополнительно подчеркивает разницу между двумя данными компартментами [12].

В образцах аферезного продукта от мобилизуемых и отлично мобилизуемых пациентов было выявлено значительное снижение уровня экспрессии CXCR4 на поверхности мобилизованных ГСК в ответ на стимуляцию Г-КСФ. Негативная корреляция эффективности мобилизации с экспрессией CXCR4 на поверхности ГСК подтверждает тесную связь снижения уровня экспрессии данного рецептора в ответ на стимуляцию Г-КСФ и/или химиотерапевтическими агентами с увеличением миграционного потенциала ГСК и усилением их эмиграции из костного мозга. Полученные результаты полностью согласуются с результатами исследования D. Dlubek et al., в котором были проанализированы данные по MFI CXCR4 на поверхности мобилизованных ГСК от 90 здоровых доноров. Было выявлено, что для мобилизованных ГСК характерен стабильно низкий уровень экспрессии CXCR4 [13]. Снижение уровня экспрессии CXCR4 свидетельствует о потенциальной восприимчивости ГСК к действию Г-КСФ у мобилизуемых пациентов. Различия в эффективности мобилизации между группами мобилизуемых и отлично мобилизуемых пациентов, возможно, связаны опеределенными факторами, влияющими на эффективность мобилизации, в том числе, с первичным диагнозом, количеством и составом предшествующих курсов химиотерапии, а также сроками и режимами введения Г-КСФ [14].

Среди 23 циклов мобилизации, проанализированных в данном исследовании, в девяти случаях (7 первичных циклов мобилизации и 2 ремобилизации) пациенты не ответили на стимуляцию Г-КСФ и были классифицированы как немобилизуемые. Восемь из девяти немобилизуемых пациентов получили более пяти циклов полихимиотерапии. В двух случаях пациенты (ж/52/PMЖ/рецидив III, м/24/ОНЛ/рецидив I) не ответили ни на первый, ни на второй цикл мобилизации ГСК. Во всех случаях пациенты получали Г-КСФ не менее 5 дней в дозе не менее 10 мкг/кг/день, однако на поверхности мобилизованных ГСК в аферезном продукте был выявлен чрезвычайно высокий уровень экспрессии CXCR4, что может свидетельствовать о внутренней резистентности к действию Г-КСФ одновременно с истощенностью пула ГСК. M. Dabusti et al. связывают отсутствие ответа на стимуляцию именно со снижением пула доступных для мобилизации ГСК вследствие значительного повреждения стромы костного мозга химиотерапевтическими агентами [15]. Также необходимо учитывать, что кинетика мобилизации у предлеченных пациентов может значительно отличаться от таковой у здоровых доноров, а пик мобилизации пациентов может быть отсрочен [16]. Сохранение высокого уровня

экспрессии CXCR4 при отсутствии адекватного ответа на мобилизацию делает безусловно привлекательным подход по усилению целевого воздействия на контакт CXCR4–SDF–1, которое возможно при совместном назначении Г–КСФ с селективным антагонистом SDF–1 – AMD3100 (Mozobil™), для повышения эффективности мобилизации.

В данном исследовании мы выявили достоверные различия по плотности экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК, полученных из нативных источников (нормальный костный мозг, пуповинная кровь) и после стимуляции Г–КСФ (за исключением группы немобилизуемых пациентов). Последовательное

снижение плотности экспрессии CXCR4 (нормальный костный мозг > праймированный костный мозг > продукт афереза от мобилизуемых пациентов) под воздействием Г–КСФ свидетельствует о комплексном, зависимом от времени воздействии данного ростового фактора на адгезионный профиль ГСК. Отсутствие снижения уровня экспрессии CXCR4 на поверхности ГСК у немобилизуемых пациентов указывает на дисбаланс регуляции процессов направленной миграции у предлеченных пациентов и требует оптимизации режимов мобилизации с включением селективных агентов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Copelan E.A. Hematopoietic stem cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 1813–26.
2. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in hematopoietic stem cells transplantation: stem cell source. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007; 20(2): 265–80.
3. Schoemans H., Theunissen K., Maertens J. et al. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transpl.* 2006; 38: 83–93.
4. Ostronoff M., Ostronoff F., Souto Maior P. et al. Pilot study of allogeneic G–CSF–stimulated bone marrow transplantation: harvest, engraftment and graft versus host disease. *Biol. Blood Marrow Transpl.* 2006; 12: 729–33.
5. Koenigsmann M., Jenths–Ullrich K., Mohren M. et al. The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization. *Transfusion* 2004; 44: 777–84.
6. Winkler I., Levesque J.–P. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp. Hematol.* 2006; 34: 996–1009.
7. Levesque J.–P., Hendy J., Takamatsu Y. et al. Mobilization by either cyclophosphamide or colony–stimulating factor transforms the bone marrow into highly proteolytic environment. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 440–9.
8. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M. et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *J. Hematother.* 1996; 5: 213–26.
9. Stiff P.J. Management strategies for hard–to–mobilize patient. *Bone Marrow Transpl.* 1999; 23(sup.2): S29–S33.
10. Bradley B., Cairo M. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human Immunol.* 2005; 66: 431–46.
11. Wilson A., Trumpp A. Bone–marrow hematopoietic stem cell niches. *Nature Rev. Immunol.* 2006; 6: 93–106.
12. Oelschlaegel U., Bornhauser M., Boxberger S. et al. Kinetics of CXCR4 and adhesion molecule expression during autologous stem cell mobilization with G–CSF and AMD3100 in patients with multiple myeloma. *Ann. Hematol.* 2007. In press.
13. Dlubek D., Drabszak–Skrzypek D., Lang A. Low CXCR4 membrane expression on CD34⁺ cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transpl.* 2006; 37: 19–23.
14. Ikeda K., Kozuka T., Harada M. Factors for PBPC collection efficiency and collection predictors. *Transfusion Apheresis Sci.* 2004; 31: 245–59.
15. Dabusti M., Lanza F., Campioni D. et al. CXCR4 expression on bone marrow CD34⁺ cells prior to mobilization can predict mobilization adequacy in patients with hematological malignancy. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003; 12(4): 425–34.
16. Seggewiss R., Buss E.C., Herrmann D. et al. Kinetics of peripheral blood stem cells mobilization following G–CSF–supported chemotherapy. *Stem Cells* 2003; 21(5): 568–74.

Поступила 23.08.2007