

(n=7), из которых 8% (n=1) имели ПО, 17% (n=2) имели ОХЧО и 33% (n=4) имели частичный ответ, как лучший ответ. У 3 пациентов (25%) была отмечена стабилизация заболевания и у 2 пациентов (17%) наблюдалось прогрессирование заболевания. Медиана (диапазон) времени до ответа составила 3 (1-8) месяцев и медиана (диапазон) длительности ответа составила 7 (2-13) месяцев. 11 (92%) пациентов имели как минимум 1 нежелательное явление. У 5 (42%) пациентов наблюдалась анемия (у 2 (17%) – 3 степени), у 6 (50%) – тромбоцитопения (2 пациента имели 4 степень), у 4 (33%) – нейтропения (у 2 (17%) – 3-4 степени), у 1 (8%) развилась диарея 1 степени, и у 3 (25%) пациентов были отмечены инфекции верхних дыхательных путей. 33% пациентов (n=4) имели нежелательные явления ≥ 3 степени. До IRd 6 пациентов имели множественные линии терапии, в том числе леналидомид-содержащие, и 6 пациентов были леналидомид-наивными и получили только 1 линию терапии перед IRd. Различия в частоте общего ответа между пациентами с множественными предшествующими линиями терапии (частота общего ответа=33%,

n=2) и пациентами, получившими 1 линию терапии перед режимом IRd (частота общего ответа=87%, n=5), не были статистически значимыми (p=0,079). Однако частота ПО и ОХЧО была значительно выше в группе, которая получала IRd, как терапию второй линии (0% против 50%, p=0,046).

Заключение

Терапия, основанная на иксазомибе, показала хорошую эффективность (частота общего ответа 58%) и приемлемую токсичность. Пациенты, не получавшие ранее леналидомид и имевшие только 1 предшествующую линию терапии, имеют статистически значимо более высокую частоту ПО и ОХЧО. На основе этого, можно предположить, что использование режима IRd в качестве терапии второй линии может улучшить глубину ответа пациентов с ММ, включая резистентные формы.

Ключевые слова

Миеломная болезнь, рефрактерная форма, рецидивы, иксазомиб, эффективность.

Evaluation of hematopoietic stem cells in peripheral blood and apheresis product on the hematological analyzer Sysmex XN (XN-HPC): a clinical case

Tatiana S. Shchegoleva, Marina A. Gorodnova, Valentina M. Kravtsova, Vladislav S. Sergeev, Elena V. Babenko, Maria A. Estrina, Polina S. Kuga, Irina I. Kulagina, Marina O. Popova, Tatyana V. Andreeva, Asmik G. Gevorgyan, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children's Oncology, Hematology and Transplantation at the First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Tatyana S. Shchegoleva
E-mail: 4190771@gmail.com

Background

The routine method for evaluation of hematopoietic stem cells (HSC) is flow cytometry using labeled antibodies and vital dye. Serious disadvantages of this method include the difficulty of standardization, the lack of automation, the high labor costs of qualified personnel, and the relative high cost of consumables. Frequent evaluation of HSC in peripheral blood (PB) and apheresis products are a high clinical need test. The development of standardized, automated methods of HSC evaluation is an actual challenge. Sysmex-XN is a clinical hematological analyzer which has already had all the necessary facilities for standardizing the evaluations conducted on it. Currently, the ability to evaluate the number of HSCs on Sysmex-XN in a WPC channel in the XN-HPC mode has been developed. The evaluation of HSC by this method is at research stage, but in the future it can be introduced into clinical practice in addition to the routine method in the case of obtaining comparable data. Aim of this study was to compare the data of the quantitative evaluation of HSC in peripheral blood and apheresis product after mobilization with G-CSF by two methods, as well as labor and financial costs.

Materials and methods

As a standard, the HSC counting method was used: counting of leukocytes in the Goryaev' chamber and flow cytometry with markers CD45/CD34/7AAD (BD, San Jose, USA) using BD FacsCalibur and the ISHAGE protocol. A new method is an automated method for calculating HSC, available on Sysmex XN analyzers (XN-HPC) in the WPC channel, based on measuring the size, structure, and fluorescence intensity of cells. Samples of PB and apheresis product were taken for research from same specimens. The HSCs were collected on a COBE Spectra separator.

Results

We report a clinical case of the patient G., 2 years 4 months, height 85.5 cm, weight 15 kg, with the diagnosis of medulloblastoma. The treatment of relapse has to include high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation. Harvesting HSCs of PB was performed after stimulation of G-CSF in a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ once for 5 days. Apheresis was performed on the fifth day of mobilization. The volume of perfusion was 2900.0 ml, 230.0 ml of concentrate was obtained. The comparative results of the studies

are presented in the tables: (1) the quantitative evaluation of HSC in the PB, (2) the estimation of the amount of HSC in the apheresis concentrate, (3) the financial and labor costs evaluation (without depreciation of equipment and utility costs).

Conclusions

The presented clinical case demonstrates that the results of quantitative evaluation of HSC on the Sysmex-XN analyzer are comparable with the results of the routine method, while labor and financial costs are at least 3 times lower. The speed of obtaining the result and the relatively low cost make it possible to propose the use of quantitative evaluation of HSC on the Sysmex-XN analyzer as an additional screening

method, the results of which will subsequently be validated by the standard method of investigation. The introduction of a new screening method for evaluation of HSCs will lead to optimization of the peripheral blood HSC harvesting protocols and, as a consequence, to obtaining HSC transplants of better quality. Nevertheless, to use the new method in clinical practice, it is necessary to conduct comparative studies on the evaluation of HSC in the PB and apheresis products from a broad cohort of donors/patients.

Keywords

Hematopoietic stem cells, peripheral blood, HSC harvesting, apheresis concentrate, flow cytometry, Sysmex-XN, quantitative HSC screening.

Table 1. Evaluation of HSCs in peripheral blood

Manual Goryaev' hemocytometric chamber and FACS Calibur			
PB	Leukocytes (*10 ⁹ /n)	CD45+CD34+7AAD-	CD45+CD34+7AAD-
4 day	46.37	0.10%	46.37 cell/mkl
5 day	47.20	0.14%	66.08 cell/mkl
Sysmex-XN (XN-HPC)			
PB	Leukocytes (*10 ⁹ /n)	HPC	HPC
4 day	45.26	0.13%	59 cell/mkl
5 day	47.24	0.12%	58 cell/mkl

Table 2. The evaluation of HSCs in apheresis concentrate

Apheresis concentrate	Manual hemocytometric chamber and FACS Calibur	Sysmex-XN (XN-HPC)
Leukocytes (NC*10 ⁸ /kg)	30.05	31.63
HSCs %	0.25	0.27
HSCs/*10 ⁶ /kg	7.51	8.54

Table 3. Evaluation of time expenses and financial costs

Manual Goryaev' chamber counts and FACS Calibur		Sysmex-XN (XN-HPC)	
Procedures	min	Procedures	min
Preparation and staining of the sample	5-10	-	-
Cells counting	3-5	-	-
Evaluation % CD45+CD34+7AAD- cells	5-7	Counting absolute leukocyte numbers and % HPC	2-4
Evaluation of results, preparation of conclusion	5-10	Evaluation of results, preparation of conclusion	3-5
Sum:	18-33	Sum:	5-9
Financial costs	Rub	Financial costs	Rub
antibodies (CD45-FITC/CD34-PE), 1 test	540	Reagent kit	197
7-ADD, 1 test	10		
Consumables (test tubes, tips, working fluids, etc.)	50	Consumables (test tubes)	6
Working time of the specialist (25 min)	142	Working time of the specialist (7 min)	40
Sum:	742	Sum:	243

Определение гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови и продукте афереза на гематологическом анализаторе Sysmex XN (XN-НРС): клинический случай

Татьяна С. Щеголева, Марина А. Городнова, Валентина М. Кравцова, Владислав С. Сергеев, Елена В. Бабенко, Мария А. Эстрина, Полина С. Куга, Ирина И. Кулагина, Марина О. Попова, Татьяна В. Андреева, Асмик Г. Геворгян, Людмила С. Зубаровская, Борис В. Афанасьев

Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова

Введение

Рутинным методом определения количества гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является проточная цитофлуориметрия с использованием меченых антител и витального красителя. К серьезным недостаткам данного метода можно отнести сложность стандартизации, отсутствие автоматизации, большие трудозатраты квалифицированного персонала, а также относительная дороговизна расходных материалов. В связи с высокой потребностью частого определения ГСК в периферической крови (ПК) и продуктах афереза существует необходимость разработки стандартизированных, автоматизированных методов. Sysmex-XN является используемым в клинической практике гематологическим анализатором, имеющим все необходимые возможности для стандартизации проводящихся на нем исследований. В настоящее время разработана возможность определения количества ГСК на Sysmex-XN в канале WPC в режиме XN-НРС. Определение ГСК данным методом является исследовательским, но в перспективе может быть внедрено в клиническую практику в дополнение к рутинному методу в случае получения сопоставимых данных. Целью работы было сравнение данных по количественному определению ГСК в ПК и продукте афереза после мобилизации с помощью Г-КСФ двумя методами, а также трудовых и финансовых затрат.

Методы

В качестве стандарта использовался метод подсчета ГСК: подсчет лейкоцитов в камере Горяева и проточная цитофлуориметрия с маркерами CD45/CD34/7AAD (BD; San Jose, USA) на аппарате BD FACS Calibur по протоколу ISHAGE. Исследуемый метод – автоматизированный метод подсчета ГСК, доступный на анализаторах Sysmex XN (XN-НРС) в канале WPC, основанный на измерении размера, структуры и интенсивности флуоресценции клеток. Пробы ПК и продукта афереза забирались для исследований из одних образцов. Заготовка ГСК проводилась на сепараторе COBE Spectra.

Результаты

Представляется клинический случай пациентки Г., 2 г. 4 мес., рост 85,5 см., вес 15 кг, с диагнозом медуллобластома. Для лечения рецидива планируется высокодозная химиотерапия с аутотрансплантацией ГСК. Заготовка ГСК ПК проводилась после стимуляции Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг однократно в течение 5-ти дней. На пятый день выполнен аферез. Объем перфузии составил 2900.0 мл, получено 230.0 мл концентрата. Результаты исследований представлены в таблицах: (1) количественное определение ГСК в ПК, (2) оценка количества ГСК в аферезном концентрате, (3) оценка финансовых и трудозатрат (без учета амортизации оборудования и коммунальных затрат).

Выводы

Представленный клинический случай демонстрирует, что результаты количественного определения ГСК на анализаторе Sysmex-XN сопоставимы с результатами рутинного метода, в то время как трудовые и финансовые затраты по меньшей мере в 3 раза ниже. Быстрота получения результата и относительно низкая стоимость позволяет предложить использование количественного определения ГСК на анализаторе Sysmex-XN в качестве дополнительного скринингового метода, результаты которого в дальнейшем будут валидироваться стандартным методом исследования. Внедрение нового скринингового метода определения ГСК приведет к оптимизации алгоритмов проведения афереза и, как следствие, получению трансплантатов ГСК лучшего качества. Тем не менее, для использования нового метода в клинической практике необходимо проведение сравнительных исследований по количественному определению ГСК в ПК и продуктах афереза от широкой когорты доноров/пациентов.

Ключевые слова

Гемопоэтические стволовые клетки, заготовка ГСК, периферическая кровь, продукт афереза, проточная цитофлуориметрия, Sysmex-XN, скрининг количества ГСК.

Таблица 1. Результаты исследований ПК

Камера Горяева и FACS Calibur			
ПК	лейкоциты (*10 ⁹ /л)	CD45+CD34+7AAD-	CD45+CD34+7AAD-
4 день	46,37	0,10%	46,37 кл/мкл
5 день	47,20	0,14%	66,08 кл/мкл
Sysmex-XN (XN-НРС)			
ПК	лейкоциты (*10 ⁹ /л)	НРС	НРС
4 день	45,26	0,13%	59 кл/мкл
5 день	47,24	0,12%	58 кл/мкл

Таблица 2. Результаты исследований аферезного концентрата

Аферезный концентрат	Камера Горяева и FACS Calibur	Sysmex-XN (XN-НРС)
Лейкоциты (НС*10 ⁸ /кг)	30,05	31,63
ГСК %	0,25	0,27
ГСК/*10 ⁶ /кг	7,51	8,54

Таблица 3. Оценка финансовых и трудозатрат

Камера Горяева и FACS Calibur		Sysmex-XN (XN-НРС)	
Трудозатраты	мин.	Трудозатраты	мин.
Подготовка и окрашивание образца	5-10	-	-
Подсчет клеток	3-5	-	-
Оценка % CD45+CD34+7AAD- клеток	5-7	Подсчет абсолютного числа лейкоцитов и % НРС	2-4
Оценка результатов, подготовка заключения	5-10	Оценка результатов, подготовка заключения	3-5
ИТОГО:	18-33	ИТОГО:	5-9
Финансовые затраты	руб.	Финансовые затраты	руб.
Антитела (CD45-FITC/CD34-PE), 1 тест	540	Набор реагентов	197
7-ADD, 1 тест	10		
Расходные материалы (пробирки, наконечники, рабочие жидкости и др.)	50	Расходные материалы (пробирки)	6
Рабочее время врача КЛД (25 мин.)	142	Рабочее время врача КЛД (7 мин.)	40
ИТОГО:	742	ИТОГО:	243

Comparative analysis of late effects after treosulfan- and busulfan-based myeloablative conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children

Yulia V. Skvortsova ¹, Irina P. Shipitsina ¹, Dmitriy N. Balashov ¹, Pavel E. Trakhtman ¹, Elena V. Skorobogatova ², Ludmila I. Papusha ¹, Elena I. Gutovskaya ¹, Larisa N. Shelikhova ¹, Elena E. Kurnikova ¹, Kirill A. Voronin ¹, Michael A. Maschan ¹, Alexei A. Maschan ¹

¹ Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russian Federation)

² Russian Children's Hospital, Moscow, Russian Federation

Contact: Dr. Yulia V. Skvortsova

E-mail: yuscvo@mail.ru

Introduction

Treosulfan is actively used as myeloablative and immunosuppressive agent in modern conditioning regimens, while exhibiting a reduced early toxicity in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). But there are no data about long-term effects. The aim of this

study was retrospective analysis of late effects after treosulfan- and busulfan-based myeloablative conditioning regimens in children.

Methods

We propose a comparative analysis of late effects in children, who got allo-HSCT at BMT Department of Russian Chil-