

## MOBILIZATION POTENTIAL OF PATIENTS WITH LYMPHOMAS AND MULTIPLE MYELOMA INVOLVED IN AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANT

### MOBILIZACIONI POTENCIJAL BOLESNIKA SA LIMFOMIMA I MULTIPLIM MIJELOMOM UKLJUČENIH U AUTOLOGNU TRANSPLANTACIJU MATIČNIH ĆELIJA HEMATOPOEZE

Katarina Stančev<sup>1</sup>, Milena Todorović Balint<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za hematologiju, Beograd, Srbija

**Correspondence:** katarina.stancev.mfub@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** High-dose chemotherapy by following autologous stem cell transplant (ASCT) is a standard treatment of multiple myeloma (MM), relapse of Hodgkin's lymphoma (HL) and non-Hodgkin's lymphomas (NHL). Monitoring of clinical and biochemical characteristics, as well as post-transplant parameters, all point to the importance of mobilization potential.

**Aim:** To evaluate the association of early recovery of neutrophil granulocytes  $\geq 0.5 \times 10^9/L$  after 11 days of transplantation (ANC500\_11), platelets  $\geq 20 \times 10^9/L$  after 13 days of transplantation (PLT20\_13) with gender, age, duration of mobilization, as well as radiotherapy or chemotherapy, dose CD34<sup>+</sup> cells in the apheresis product and therapeutic response.

**Material and Methods:** The retrospective study included 100 patients, out of which 51 patients with MM, 27 with NHL and 22 with HL, in the period from November 2015, ending December 2018.

**Results:** The median age of the patient was 53(20-67) years. According to the DSS, 69% were in IIIA, while 12.5% of patients were in the IIIB clinical stage. According to the Ann-Arbor staging 92% patients were in the II or III clinical stage. The median number of CD34<sup>+</sup> cells in the apheresis product was  $6.7 \times 10^6/kgBM$ . The median in all three mobilization attempts was 6 days. Engraftment is most often detected during the 11th day. In 78% of patients, mobilization was successful in the first attempt ( $\geq 2.0 \times 10^6/kgBM$ ) among which 86% were MM and 69,4% of lymphomas ( $p < 0.05$ ). The impacts of age, the number of CD34<sup>+</sup> cells in the peripheral blood and the duration of the mobilization did not show a significant difference ( $p > 0.05$ ) in relation to the recovery of ANC500\_11 and PLT20\_13.

**Conclusion:** Satisfactory CD34<sup>+</sup> cellular yield can be provided in the first mobilization attempt in most of the patients using of GCS-F, while in the further mobilization attempts plerixafor was necessary. As opposed to gender, age, duration of mobilization and therapeutic response have no impact on ANC500\_11 and PLT20\_13.

#### Keywords:

autologous transplantation,  
multiple myeloma,  
non-Hodgkin's lymphomas,  
Hodgkin's lymphoma,  
mobilization

## Sažetak

**Uvod:** Visokodozna hemioterapija praćena autolognom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze (ATMČH) je standard u lečenju multiplog mijeloma (MM), relapsa Hoćkinovog limfoma (HL) i nehoćkinskih limfoma (NHL). Praćenje kliniĉko-biohemijskih, patohistoloških i posttransplantacionih parametara pokazuje važnost mobilizacionog potencijala.

**Cilj:** Cilj rada je ispitati povezanosti znakova ranog oporavka neutrofila  $\geq 0,5 \times 10^9/L$  nakon 11 dana od transplantacije (ANC500\_11) i trombocita  $\geq 20 \times 10^9/L$  nakon 13 dana od transplantacije (PLT20\_13) sa polom i starošću, dužinom mobilizacije, uticajem radioterapije, hemioterapije, dozom CD34<sup>+</sup> ćelija u afereznom proizvodu i terapijskim odgovorom.

**Materijali i metode:** Retrospektivna studija obuhvata 100 bolesnika, od toga 51 bolesnika sa MM, 27 sa NHL i 22 sa HL u periodu od novembra 2015. zakljuĉno sa decembrom 2018.

**Rezultati:** Medijana starosti bolesnika bila je 53 (20-67). Prema Duri-Salmonovoj (Durie-Salmon) klasifikaciji 69% je bilo u IIIA, a 12,5% u IIIB kliniĉkom stadijumu, dok je prema ISS-u 10,4% bolesnika bilo u II stadijumu i 64,6% u III stadijumu bolesti. Prema Ann Arbor klasifikaciji 92% bolesnika je bilo u II ili III stadijumu bolesti. Medijana CD34<sup>+</sup> ćelija u afereznom proizvodu iznosi  $6,7 \times 10^6/kg$  TM. Medijana mobilizacije je kod sva tri mobilizaciona pokušaja iznosila 6 dana. Engraftment je najĉešće detektovan 11. dana nakon transplantacije. Kod 78% bolesnika mobilizacija je bila uspešna u prvom pokušaju ( $\geq 2,0 \times 10^6/kg$  TM), meĉu kojima je bilo 86% obolelih od MM i 69,4% od limfoma, s boljim mobilizacionim potencijalom bolesnika sa MM. Broj CD34<sup>+</sup> ćelija smanjuje se sa dužinom mobilizacije. Uticaj pola, starosti, broj CD34<sup>+</sup> ćelija u perifernoj krvi i dužina mobilizacije nisu pokazali statistiĉki znaĉajnu razliku ( $p > 0,05$ ) u vezi sa oporavkom ANC500\_11 i PLT20\_13.

**Zakljuĉak:** Kod većine bolesnika zadovoljavajući CD34<sup>+</sup> ćelijski prinos mođe se obezbediti u prvom mobilizacionom pokušaju primenom granulocitnog faktora rasta, dok je u naknadnim mobilizacionim pokušajima neophodan pleriksafor. Smanjenje kvaliteta afereznog proizvoda u direktnoj je vezi sa dužim trajanjem mobilizacije, nasuprot polu, starosti, dužini mobilizacije i terapijskom odgovoru, koji nemaju uticaja na ANC500\_11 i PLT20\_13.

### Ključne reći:

autologna  
transplantacija,  
multipli mijelom,  
nehoćkinski limfomi,  
Hoćkinov limfom,  
mobilizacija

## Uvod

Multipli mijelom (MM) i limfomi su neoplazme hematopoeznog i limfoidnog sistema. Multipli mijelom predstavlja monoklonsku proliferaciju plazma ćelija (1). Prema Nacionalnom registru za rak iz 2012. godine (2), u centralnoj Srbiji najĉešće obolevaju stariji od 65 godina. Duri-Salmonov system (Durie-Salmon System, DSS) daje prognostiĉke markere za procenu obima bolesti i veliĉine tumora (3). Meĉunarodni sistem za odreĉivanje stadijuma bolesti (engl. *International Staging System, ISS*) opisuje faktore koji utiĉu na preživljavanje (3). Terapijski odgovori na kojima se baziraju novije strategije lećenja su postizanje kompletne remisije (KR) i veoma dobre parcijalne remisije (VDPR), eventualno parcijalne remisije (PR), nasuprot stabilnoj bolesti (SB), progresivnoj bolesti (PB) i relapsu bolesti (RB) (3) (tabela 1).

Limfomi nastaju kao posledica maligne alteracije limfocita u limfnim tkivima sa razliĉitim obrascima kliniĉkog ponašanja i odgovora na lećenje. Mogu se ispoljiti kao nodalni (u limfnom ćvoru) ili ektranodalni limfomi (u limfnom tkivu razliĉitih organa) (4). Najĉešće zrele limfoidne neoplazme obuhvataju nehoćkinske limfome (NHL), dok je Hoćkinov limfom (HL) znatno reĉi (5).

Kliniĉki stadijumi bolesti odreĉuju se prema *Ann Arbor* klasifikaciji (6).

Autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (ATMČH) predstavlja standard u lećenju pacijenata sa MM i relapsu limfoma nakon prethodne primene visokodozne hemioterapije. Periferna krv (PK) predstavlja glavni izvor CD34<sup>+</sup> matičnih ćelija. Prednosti ovakve procedure su izostanak korišćenja opšte anestezije i neizlaganje pacijenta bolu tokom višestrukih aspiracija koštane srži, uz brži engraftment matičnih ćelija koštane srži (7, 8). Ekspresija hemokinskog receptora CXCR4 na površini CD34<sup>+</sup> matičnih ćelija uspostavlja komunikaciju sa stromalnim ćelijama koštane srži preko stromalnog faktora 1  $\alpha$  (SDF-1  $\alpha$ ) (7). Efikasnost mobilizacije CD34<sup>+</sup> matičnih ćelija utiĉe na broj neophodnih leukaferaza, kao i na sam uspeh transplantacije (7). Standardni agens koji se koristi u mobilizaciji matičnih ćelija je granulocitni faktor rasta (G-CSF) jer stimuliše sekreciju metaloproteinaze-9 koja oslobaĉa CD34<sup>+</sup> ćelije iz niša koštane srži (8). Upotrebom pleriksafora (Mozobil®) direkno i reverzibilno se inhibira CXCR4-SDF-1 $\alpha$  (9) i tako se mobilise veća koliĉina CD34<sup>+</sup> ćelija. Primena ovog leka je izuzetno znaĉajna kod pacijenata koji su nakon standardne primene G-CSF imali slab prinos matičnih ćelija. Takvi bolesnici predstavljaju

**Tabela 1.** Uniformni kriterijumi terapijskog odgovora za multipli mijelom

Kompletana remisija (KR)	Negativna imunofiksacija u serumu i urinu, nestanak plazmocitoma solitarnih organa, < 5% plazma ćelija u koštanoj srži
Veoma dobra parcijalna remisija (VDPR)	Detekcija M-proteina imunofiksacijom, ali ne i elektroforezom, ili redukcija M-proteina u serumu i nivo u urinu < 100 mg/24h urinu
Parcijalna remisija (PR)	≥ 50% redukcije M-proteina u serumu i redukcija u 24h urinu ≥ 90% ili < 200 mg/24h
Stabilna bolest (SB)	Nema kriterijuma za KR, VDPR, PR, PB
Progresivna bolest (PB)	Povećanje > 25% sledećih komponenti: M-protein u serumu (≥ 0,5 g/dL) M-protein u urinu (≥ 200 mg/24h) Plazma ćelije u koštanoj srži ≥ 10% Hiperkalcijemija (> 11,5 mg/dL ili 2,65 mmol/L) Pojava novih koštanih lezija ili rast postojećih, pojava plazmocitoma mekih tkiva
Relaps	Ponovno javljanje M-proteina u serumu ili urinu Razvoj > 5% plazma ćelija u koštanoj srži. Pojava bilo kog drugog znaka progresije bolesti

International Myeloma Working Group (IMWG) Uniform Response Criteria for Multiple Myeloma; April 21, 2010 | Diagnosis, Staging & Monitoring, Guidelines

dokazane loše mobilizatore (engl. *poor mobilizers*) budući da su im vrednosti CD34<sup>+</sup> bile ≤ 2,0 × 10<sup>6</sup> ćelija/kg telesne mase (kg/TM), tj. u PK nisu dostigli broj CD34<sup>+</sup> ćelija ≥ 20/μL standardnom primenom G-CSF (10). Njihovo lečenje može se nastaviti ATMČH uz sprovođenje višestrukih ponavljanih ciklusa mobilizacije radi sakupljanja dovoljnog broja CD34<sup>+</sup> ćelija što, s druge strane, smanjuje kvalitet života pacijenata, izlaže ih dodatnim rizicima i značajno povećava troškove lečenja (11). Preporučena dnevna doza pleriksafora je 0,24 mg/kg. Primena leka je supkutana, 6 do 11 sati pre afereze, a nakon 4-6 dana od primene G-CSF-a u dozi od 10-16 μg/kg TM.

Ciljevi ove studije bili su ispitivanje povezanosti znakova ranog oporavka neutrofilnih granulocita ≥ 0,5 × 10<sup>9</sup>/L nakon 11 dana od transplantacije (ANC500\_11) i trombocita ≥ 20 × 10<sup>9</sup>/L nakon 13 dana od transplantacije (PLT20\_13) sa brojnim pretransplantacionim parametrima. Ispitivani su uticaji pola i starosti bolesnika, primena radioterapije kod pojedinih bolesnika, broj hemioterapijskih linija, dužina mobilizacije, terapijski odgovor, apsolutni broj leukocita i doza CD34<sup>+</sup> ćelija u afereznom proizvodu. Upoređene su grupe bolesnika koji su mobilisani standardnim protokolom mobilizacije sa dozama G-CSF-a 10-16 μg/kg TM, kao i grupa bolesnika tzv. loših mobilizatora koji su primali G-CSF 10-16 μg/kg TM uz dodatak pleriksafora u preporučenoj dozi od 0,24 mg/kg.

## Materijali i metode

U ovu retrospektivnu studiju bilo je uključeno 100 bolesnika lečenih u trogodišnjem vremenskom intervalu od novembra 2015. zaključno sa decembrom 2018. godine. Dijagnozu MM imao je 51 bolesnik, HL 22 i NHL 27 bolesnika. Medijana starosti ispitanika iznosi 53 godina, u starosnom rasponu od 20 do 67 godina. Bolesnici su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Svi bolesnici koji su uključeni u studiju bili su u programu ATMČH.

## Kondicioni režim

Kondicioni režimi koji su korišćeni kod bolesnika sa HL i NHL su BEAM (karmustin 300 mg/m<sup>2</sup>, etoposid 800 mg/m<sup>2</sup>, citarabin 1600 mg/m<sup>2</sup> i melfalan 140 mg/m<sup>2</sup>) i CBV (ciklofosamid 6000 mg/m<sup>2</sup>, karmustin 300 mg/m<sup>2</sup>, etoposid 750 mg/m<sup>2</sup>). Oboleli od MM primili su melfalan (200 mg/m<sup>2</sup> ili redukovan u dozi 140 mg/m<sup>2</sup> u skladu sa indikacijom).

## Mobilizacija CD34<sup>+</sup> ćelija u perifernoj krvi

Standardizovan proces mobilizacije CD34<sup>+</sup> u PK obuhvata primenu G-CSF-a u takozvanim uslovima stabilnog stanja (*“steady state”*) bez prethodne primene hemioterapije, u dozi 10-16 μg/kg TM, u trajanju prosečno 5 dana. Sa nadzorom CD34<sup>+</sup> ćelija u PK protočnom citometrijom (*Beckman-Coulter*, USA) započinjalo se 4. ili 5. dana, tj. kada je broj leukocita u perifernoj krvi bio ≥ 1,5 × 10<sup>9</sup>/L, kako bi se odredio pravi trenutak za početak leukaferoze i uočili mogući loši mobilizatori. Preaferezni pik CD34<sup>+</sup> ćelija u PK ≥ 20 μL, dok su optimalne vrednosti ≥ 40 μL, važan je pokazatelj za započinjanje postupka leukaferoze. U slučaju detekcije nižih vrednosti CD34<sup>+</sup> ćelija u PK, te osobe su prepoznate kao loši mobilizatori i zbog toga su dobijale G-CSF u standardnoj dozi, uz pleriksafor u pojedinačnoj dozi 0,24 mg 6-8 sati pre same leukaferoze. Najnovije studije dele mišljenje da je neophodno prikupiti 2 × 10<sup>6</sup> ćelija/kg TM, optimalne vrednosti ≥ 4 × 10<sup>6</sup> ćelija/kg TM. Jasno je da je ovo jedino moguće odrediti tek nakon što je leukaferoza izvedena. Sakupljene ćelije su zamrzavane pomoću originalne procedure zamrzavanja programiranom kriokonzervacijom sa optimizovanim dimetil-sulfidom (10% DMSO) i skladištene na -140 ± 5 °C ili na -196 °C u tečnom azotu, pa odmrzavane neposredno pre korišćenja u vodenom kupatilu na 37 ± 3 °C.

## Transplantacija

Pacijenti su podvrgnuti mijeloablativnoj visokodoznoj hemioterapiji, u fazi pripreme za ATMČH.

Transplantacija je izvršena u roku od 4 do 6 nedelja posle poslednje afereze.

#### Prikupljanje kliničkih podataka

Iz istorija bolesti za analizu su korišćeni: demografski podaci, klinički stadijum, broj prethodnih hemioterapijskih i radioterapijskih protokola, terapijski odgovor nakon transplantacije stotog dana (D + 100), dan engraftmenta, laboratorijske analize i broj sprovedenih leukafereza. Praćene su vrednosti leukocita i kvalitet CD34<sup>+</sup> ćelijskog prinosa koji je predstavljen brojem CD34<sup>+</sup> matičnih ćelija u PK, brojem CD34<sup>+</sup> ćelija sakupljen po aferezi i ukupnim prinosom CD34<sup>+</sup> matičnih ćelija. Granične vrednosti oporavka apsolutnog broja neutrofila  $\geq 500 \times 10^9/L$  (ANC500\_11) na dan +11 i trombocita  $\geq 20 \times 10^9/L$  (PLT20\_13) na dan +13 određivane su iz dostupnih podataka.

#### Statistička analiza

Za deskriptivnu statistiku korišćene su mere centralne tendencije, apsolutne mere varijacije (standardna devijacija), za kontinuirane varijable apsolutne frekvencije i procenti za kategoričke varijable; za testiranje značajnosti razlike korišćen je  $\chi^2$  test, a statistički značajnim smatrane su sve vrednosti  $p < 0,05$ . Korelacije između niza varijabli

dobijene su pomoću Spirmanovog (*Spearman*) koeficijenta korelacije rangova i Pirsonovog (*Pearson*) linearnog koeficijenta korelacije. Povezanost nominalnih podataka ispitivana je primenom Man-Vitnijevog (*Mann-Whitney*) U-testa. Dobijeni rezultati su analizirani pomoću kompjuterskog programa SPSS (engl. *Statistical Package for the Social Sciences*) ver22.

## Rezultati

### Pretransplantacione karakteristike bolesnika

Od 100 analiziranih bolesnika, polovina je obolela od MM (50), 27% od NHL, a 22% od HL. Medijana starosti iznosila je 53 (raspon 20-67) godina. Kliničke karakteristike bolesnika prikazane su u tabeli (**tabela 2**). Kod jednog bolesnika potvrđena je dijagnoza ekstramedularnog plazmocitoma, ali je zbog biološke sličnosti i protokola lečenja posmatran zajedno sa grupom MM. Šezdeset i pet bolesnika (65%) bili su pripadnici muškog, a 35 ženskog (35%) pola. Ne samo što su oboleli od MM bili stariji (59; raspon 26-67) od NHL bolesnika (52; raspon 24-65), nego su bolesnici sa HL bili najmlađi (39; raspon 20-62). Ovo govori u prilog tome da je MM

**Tabela 2.** Kliničke i laboratorijske karakteristike analiziranih grupa bolesnika

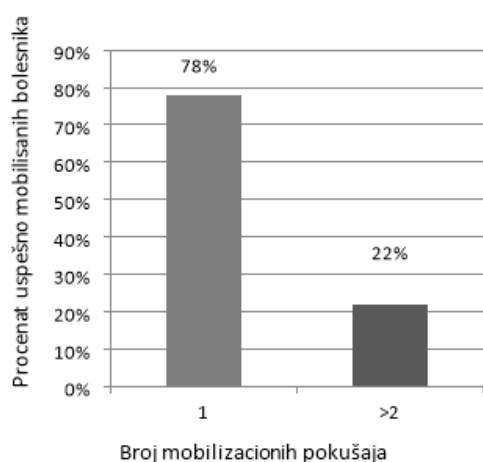
	MM	NHL + HL	$\Sigma^{**}$
Starosna dob			
Medijana (raspon)	53 (20-67)	48 (23-66)	
DSS **		Ann Arbor	
II	16,7%	I	8,5%
IIIA	68,8%	II	42,6%
IIIB	12,5%	III	48,9%
ISS **			
II	10,4%		
III	64,6%		
CD34 <sup>+</sup> ćelije (10 <sup>6</sup> kg/TM)	7,5 (0,23-19,3)	5,2 (0,48-38,9)	6,7 (0,23-38,9)
CD34 <sup>+</sup> ćelije (prinos/ $\mu$ L)	76 (2,0-193)	52 (5-389)	68 (2-389)
Le ( $\times 10^9$ )	29,1 (6,8-88,3)	30 (2,8-115,4)	29 (2,8-115,4)

\*DSS - Duri-Salmonov sistem; ISS - Međunarodni sistem za određivanje stadijuma bolesti;  $\Sigma$  - suma svih dijagnoza

karakterističan za stariju populaciju, dok se HL prvenstveno sreće u mlađem životnom dobu. Među obolelima od MM najbrojniji (69%) su bili u IIIA stadijumu bolesti (DSS), a u II stadijumu sa prisutnim B-simptomima bilo je 6 bolesnika (12,5%). Klasifikovanjem prema ISS-u, 10,4% bolesnika je bilo II kliničkom stadijumu, a 64,6% u III stadijumu bolesti. Prema *Ann Arbor* klasifikaciji, 43% i 49% bolesnika (ukupno 92%) bilo je u II i III stadijumu bolesti pred ATMČH.

### Ispitivanje mobilizacionog potencijala

Ohrabrujuć je podatak da je kod  $n = 78$  (78%) bolesnika mobilizacija uspjela u prvom pokušaju (**grafikon 1**). Kod ovih bolesnika mobilizacija je trajala 6 dana (raspon 5-11), a uočavanje prvih znakova oporavka koštane srži, tzv. engraftmenta, najčešće je bio nakon  $10,74 \pm 1,5$  dana (raspon 7-10) (**tabela 3**).

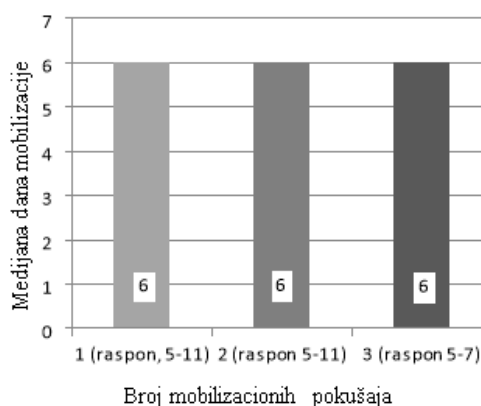


**Grafikon 1.** Procenat uspešnih mobilizacija pri prvom i zbiru drugog u trećeg mobilizacionog pokušaja

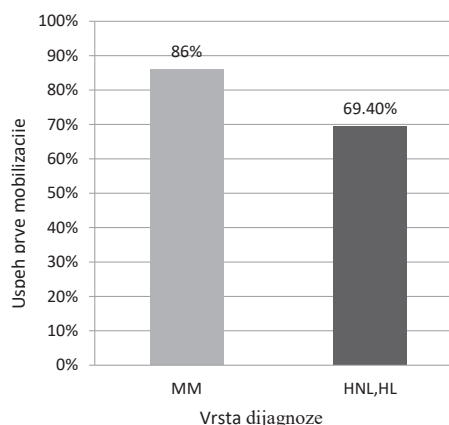
Nedovoljan mobilizacioni odgovor je kod nekolicine bolesnika zahtevao ponavljanje mobilizacionog postupka u cilju prikuljanja  $CD34^+ \geq 2 \times 10^6$  ćelija/kg TM. Dva mobilizaciona pokušaja izvedena su kod  $n = 18$  (18%) bolesnika, a medijana trajanja dana mobilizacije iznosila je 6 (raspon 5-11). Kod svega  $n = 4$  (4%) bolesnika mobilizacija je sprovedena i treći put, sa sličnim rezultatima kao i kod prethodnika (medijana 6, raspon 5-7) (**grafikon 2**). Kod ponovljenih mobilizacionih pokušaja (22%) engraftment je bio  $11,2 \pm 1,6$  dana (raspon 9-14). Nakon toga su ispitivane povezanosti broja mobilizacionih pokušaja i pojave engraftmenta. U proseku se desio 11. dana, kako nakon prvog pokušaja, tako i nakon ponovljenih mobilizacija, ali rezultati se ne mogu uzeti statistički značajnim ( $p = 0,280$ ). "Steady-state" mobilizacija sprovedena je samo kod  $n = 14$  transplantiranih bolesnika. Nije se značajno istakla razlika u pojavi engraftmenta između "steady-state" mobilizacione grupe ( $11,3 \pm 1,5$ ; raspon 9-13;  $p > 0,231$ ) i grupe koja je prethodno primala hemioterapiju ( $10,8 \pm 1,5$ ;  $p = 0,217$ ), ali je uočen duži raspon dana očekivanog engraftmenta (7-17).

Pri međugrupnom posmatranju dijagnoza i mobilizacionih pokušaja, 86% bolesnika sa MM uspešno je mobilisano u prvom pokušaju. Uspeh prve mobilizacije bio je manji kod obolelih od limfoma (69,4%) i ta razlika je bila

statistički značajna u odnosu na bolesnike sa MM koji su imali bolji mobilizacioni potencijal ( $p = 0,047$ ) (**grafikon 3**). Shodno tome, grupa bolesnika sa MM imala je veći uspeh sa ukupnim brojem  $CD34^+$  ćelija ( $\times 10^6$  kg/TM) po završenoj aferezi (medijana; 7,5 naspram 6,7). Kod 22,2% od ukupnog broja bolesnika mobilizacija je ponovljena zbog slabijeg ćelijskog prinosa.



**Grafikon 2.** Trajanje mobilizacije u zavisnosti od broja mobilizacionih pokušaja



**Grafikon 3.** Uspeh prve mobilizacije u odnosu na dijagnozu ( $\chi^2 = 3,95$ ;  $p = 0,047$ )

Medijana  $CD34^+$  ćelija u ukupnom afereznom proizvodu kod svih praćenih bolesnika bila je  $6,7 \times 10^6$ /kgTM (raspon 0,23-38,9) u volumenu od prosečno 250 mL. Prinos  $CD34^+$  ćelija/ $\mu$ L u ćelijskoj suspenziji bio je 68 (raspon 2,0-389). Kod ispitivanih bolesnika medijana broja leukocita na dan leukafereze iznosila je  $29 \times 10^9$  L, a kretala se u rasponu od  $2,8-115,4 \times 10^9$  L. Ispitivan je i mogući uticaj RT kod 30% bolesnika podvrgnutih ovom tretmanu u cilju lečenja osnovne bolesti na dužinu mobilizacije i dan engraftmenta. Kod njih je mobilizacija trajala dan duže (9 dana naspram 8 dana), dok je engraftment primećen u proseku istog, 11. dana, mada nije pronađena statistička značajnost među ispitivanim uzorcima. Primećen je progresivni trend opadanja  $CD34^+$  ćelija pri dužem trajanju mobilizacije. Sto su dani više odmicali, ćelijski pul je bio slabiji. Dani trajanja mobilizacije rangirani su u tri niva. Najviše  $CD34^+$  ćelija po aferezi imali su bolesnici čija je mobilizacija trajala od 5 do 9 dana i to

**Tabela 3.** Dužina mobilizacije i dan engraftmenta u zavisnosti od pretransplantacionih parametara

	n (%)	Dani mobilizacije (raspon)	Sig	Dan engraftmenta (raspon)	Sig
Br.mob.		6,5 ± 1,3 (5-7)		10,74 ± 1,5 (7-10)	
1	78 (78)		$p = 0,110$	/	$p = 0,219$
2	18 (18)	6,7 ± 1,6 (5-11)	$p = 0,690$	/	
3	4 (4)		$p = 0,440$	/	
2 + 3	22 (22)	6,0 ± 1,0 (5-7)		11,2 ± 1,6 (9-14)	$p = 0,280$
"Steady-state"		6,0 ± 0,8 (5-7)	$p = 0,198$		
	14 (14)	5,78 ± 0,5(5-6) /	$p = 0,140$	11,3 ± 1,3 (9-13)	$p = 0,231$
Mob. nakon primene HT		6,6 ± 1,4 (5-11)	$p = 0,198$		
	86 (86)	6,9 ± 1,7 (5-11)	$p = 0,140$	10,8 ± 1,5 (7-17)	$p = 0,217$
		6,0 ± 1,2 (5-7)	/		
RT da	30 (30)	9 ± 4,5 (5-22,0)		10,9 ± 1,1 (8-12)	
ne	70 (70)	8,0 ± 3,9 (5-21,0)	$p = 0,373$	10,8 ± 1,7 (7-17)	$p = 0,540$
CD34 <sup>+</sup> pop. (%)	0,4 ± 0,4 (0,01-2,08) 0,1 ± 0,1 (0,02-0,4) 0,07 ± 0,05 (0,01-0,15)	(5-9) <sup>(a)</sup> (10-16) (17-22)	$p < 0,01^*$ $r = -0,347$	0,4 ± 0,5 (0,45-1,47) 0,38 ± 3,4 (0,04-2,08) 0,39 ± 0,5 (0,05-1,5)	(7-9) <sup>(b)</sup> (10-12) (13-17) $p = 0,922$
CD34 <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> kg/TM)	9,4 ± 7,1(0,45-38,9) 4,5 ± 2,8 (1,1-9,6) 2,8 ± 2,3 (0,2-8,0)	(5-9) <sup>(a)</sup> (10-16) (17-22)	$p = 0,01^*$ $r = -0,339$	8,7 ± 5,1 (2,4-19,3) 8,8 ± 6,7 (1,6-38,9) 10,8,5 ± 9,56 (2,9-38,5)	(7-9) <sup>(b)</sup> (10-12) (13-17) $p = 0,989$
CD34 <sup>+</sup> (prinos/μL)	94,9 ± 70,5 (5-389,0) 45,8 ± 27,6 (11-96,0) 28,3 ± 22,7 (2,0-80,0)	(5-9) <sup>(a)</sup> (10-16) (17-22)	$p = 0,01^*$ $r = -0,340$	86,8 ± 51,4 (24,0-193,0) 88,3 ± 67,4 (16,0-389,0) 108,4 ± 95,4 (30,0-314,0)	(7-9) <sup>(b)</sup> (10-12) (13-17) $p = 0,998$
Le (x10 <sup>9</sup> )	30,7 ± 19,9 (2,8-115,4) 54,1 ± 23,4 (17,0-86,3) 38,7 ± 22,8 (14,0-88,3)	(5-9) <sup>(a)</sup> (10-16) (17-22)	$p < 0,01^*$ $r = 0,287$	37,8 ± 22,1 (6,8-81,9) 30,4 ± 17,3 (5,1-88,3) 42,1 ± 24,1 (11,5-68,1)	(7-9) <sup>(b)</sup> (10-12) (13-17) $p = 0,897$

Vrednosti su date kao srednja vrednost ± SD; \* Prihvaćen je nivo značajnosti  $p < 0,05$ ; "Steady state" - mobilizacija u stabilnom stanju; HT - hemioterapija; RT - radioterapija; r - Pirsonov linearni koeficijent korelacije; a - prikaz trajanja mobilizacije kategorisanih u tri nivoa; b - prikaz dana engraftmenta kategorisanih u tri nivoa;

9,4 ± 7,1 (raspon; 0,45-38,9) × 10<sup>6</sup>/kg TM, nasuprot drugorangiranoj i trećerangiranoj grupi bolesnika sa produženim trajanjem mobilizacije od 10 do 16 dana i od 17 do 22 dana. Broj CD34<sup>+</sup> ćelija po aferezi iznosio je 4,5 ± 2,8 (raspon; 1,1-9,6) i 2,8 ± 2,3 (raspon; 0,2-8,0). Pirsonov linearni koeficijent korelacije između dužine mobilizacije i CD34<sup>+</sup> ćelija u afereznom proizvodu ukazao je na prisustvo negativne korelacije srednjeg nivoa među ovim varijablama ( $r = -0,339$ ), što govori u prilog tome da produženo trajanje mobilizacije umnogome doprinosi smanjenom ćelijskom prinosu pri leukaferezi. Ovaj podatak imao je statističku značajnost od 0,01. Na isti način način opada i kvalitet CD34<sup>+</sup> prinos ćelija

/μ u PK u sklopu duže mobilizacije: 94,9 ± 70,5 (raspon; 5-389,0); 45,8 ± 27,6 (11-96,0); 28,3 ± 22,7 (2,0-80,0). Kako su dani mobilizacije odmicali menjao se i srednji nivo leukocita. Pozitivna korelacija navodi na mišljenje da je broj leukocita rastao uprkos porastu dana mobilizacije ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,01$ ) i, shodno tome, njihove srednje vrednosti redom iznose 30,7 ± 19,9 (raspon; 2,8-115,4); 54,1 ± 23,4 (raspon; 17,0-86,3); 38,7 ± 22,8 (raspon; 14,0-88,3). Mimo toga, detektovane vrednosti leukocita nisu uticale na raniju pojavu engraftmenta ( $p = 0,897$ ). Pri analizi kvaliteta afereznog proizvoda i dana uspostavljanja engraftmenta primećene su drugačije oscilacije

podataka. Naime, veći broj CD34<sup>+</sup> ćelija, 10,85 ± 9,56 10<sup>6</sup>kg/TM (raspon; 2,9-38,5), dobijenih prilikom leukafereze, doprineo je kasnijem (13-17 dana) udomljavanju matičnih ćelija u koštanoj srži primaoca. Oni kod kojih je engraftment primećen od 7. do 9. dana imali su u proseku 8,7 ± 5,1 (raspon; 2,4-19,3) CD34<sup>+</sup> ćelija po leukaferezi (p = 0,998).

#### Procena ranog oporavka ANC500\_11 i PLT20\_13

Pri međudijagnostičkoj analizi raspodele terapijskih odgovora detektovana je češća KR i VDPR kod obolelih od MM (21,5%) nego kod obolelih od limfoma (16,1%), bez statističke značajnosti (p = 0,189) (tabela 4).

Oporavak ANC500 opserviranog 13. dana postiglo je 45% transplantiranih bolesnika, nasuprot 90% bolesnika koji su 11. dana postigli PLT20, što predstavlja veći terapijski uspeh. Oni koji su prethodno postigli najpovoljniji pre-ATMČH terapijski odgovor (KR i VDPR) u 14% slučajeva imali su oporavak neutrofila i 36 % njih oporavak trombocita. Kod 26% bolesnika najbolji terapijski odgovor nije obezbedio rani oporavak ni neutrofila ni trombocita (3,4%), ali nije bilo statistički značajne razlike među ispitivanim uzorcima (p = 0,212; p = 0,738). To bi moglo da ukaže da postizanje KR na prvom mestu, ali i VDPR, ne znači uvek i rani oporavak neutrofila već i da ostali terapijski odgovori mogu doprineti oporavku ANC500 i PLT20\_11 određenom broju transplantiranih bolesnika. Uticaj pola na oporavak neutrofila 13. dana (26 naspram 21 %) i trombocita 11. dana (55 naspram 36 %) bio je veći kod osoba muškog pola u odnosu na osobe ženskog pola (tabela 5). Osobe starije od 50 godina su u većem broju ostvarile uspeh u oporavku trombocitne (58,1%), ali i neutrofilne populacije ćelija (26%). Kod oba ispitivana parametra, pola i starosne dobi bolesnika, nije pokazana statistička značajnost između upoređenih grupa (p > 0,05). Uključivanje radioterapije u program lečenja nije pokazalo prednost u odnosu na bolesnike koji je nisu primali u postizanju oporavka ANC500\_13 (18% naspram 29%; p = 0,148) i PLT20\_11 (24% naspram 66%; p = 0,234).

Primena jedne do tri hemioterapijskih linija dovela je oporavka neutrofila kod 40% bolesnika 13. dana od transplantacije (p = 0,298), dok je kod 73% bolesnika sa istim brojem hemioterapija primećen PLT20\_11 (p = 0,285). S druge strane, nezavisno od broja CD34<sup>+</sup> ćelija × 10<sup>6</sup> kg/TM po afereznom proizvodu, ostvareni su uspesi u oporavku ANC500\_13 i PLT20\_11. Kod 48% bolesnika primećen je ANC500\_13, a da su pri tome imali do 2,6 × 10<sup>6</sup> kg/TM CD34<sup>+</sup> ćelija (p = 0,235). Sa istim ovim afereznim dobitkom 87% bolesnika je postiglo PLT20\_11 (p = 0,187). Bolesnici koji su imali > 2,6 × 10<sup>6</sup> kg/TM CD34<sup>+</sup> ćelija nisu se naročito istakli u postizanju prvih znakova oporavka koštane srži. Daljim tokom je upoređena dužina trajanja mobilizacije u odnosu na ANC500\_13 i PLT20\_11. Kod najvećeg broja bolesnika (42%) kod kojih je oporavak ANC500 detektovan 13. dana, mobilizacija je trajala između 5 i 9 dana (p = 0,839). Duža mobilizacija nije imala ni približan uspeh (1,6% i 3,2%). Slično tome, kod 77,4/% bolesnika koji su mobilisani od 5 do 9 dana primećen je PLT20\_11 (p = 0,611). I ovog puta, duža mobilizacija je smanjila šansu za očekivani oporavak trombocita.

## Diskusija

U današnje vreme, i pored primene novih terapijskih opcija, standard u lečenju MM i limfoma predstavlja visokodozna hemioterapija sa ATMČH. Stalnim usavršavanjem ovog terapijskog modaliteta došlo se do toga da ona predstavlja neophodan, siguran i značajan vid lečenja različitih hematoloških neoplazmi (12). U ovom radu ispitivana je povezanost laboratorijsko-kliničkih parametara obolelih od MM i limfoma, uključenih u program visokodozne hemioterapije sa ATMČH. Uočljiv je trend sve većeg broja radova u ovoj oblasti koji dovode do optimizacije protokola lečenja, kao i uključivanja ATMČH u lečenje ovih bolesnika. Analiza starosnih varijacija u nasoj retrospektivnoj studiji pokazala

**Tabela 4.** Prikaz terapijskog odgovora prema vrsti bolesti i uticaj terapijskog odgovora na postizanje prvih znakova oporavka koštane srži (ANC500\_13, PLT20\_11)

	MM	HL + NHL	ANC500_13		PLT20_11	
			da	ne	da	ne
KR, VDPR (%)	20 (21,5)	15 (16,1)	8 (13,8)	15 (25,9)	21 (36,2)	2 (3,4)
PR, SB, PB, RB	25 (26,9)	33 (35,5)	18 (31,0)	17 (29,3)	31 (53,4)	4 (6,9)
Σ (93)	45 (48,4)	48 (51,6)	28 (44,8)	32 (55,2)	52 (89,7)	6 (10,3)
χ <sup>2</sup> Sig.	p = 0,189		p = 0,212		p = 0,738	

\*KR - kompletna remisija; VDPR - veoma dobra parcijalna remisija; PR - parcijalna remisija; SB - stabilna bolest; PB - progresivna bolest; RB - recidiv bolesti; Σ - suma; ANC500\_13 - apsolutni broj neutrofilnih granulocita ≥ 500 × 10<sup>6</sup> /L nakon 13 dana od transplantacije; PLT20\_11 - apsolutni broj trombocita ≥ 20 × 10<sup>9</sup>/L nakon 11 dana od transplantacije

**Tabela 5.** Uticaj pretransplantacionih parametara na postizanje prvih znakova oporavka koštane srži (ANC500\_13, PLT20\_11)

		ANC500_13 (%)			PLT20_11 (%)		
		da	ne	$\chi^2$ Sig.	da	ne	$\chi^2$ Sig.
Pol:	Muški	25,8	35,5	0,354	54,8	6,5	0,776
	Ženski	21,0	17,7		35,5	3,2	
Starosna dob:				0,149			0,908
	< 50	21,0	14,5		32,3	3,2	
	> 50	25,8	38,7		58,1	6,5	
RT:	da	17,7	11,3	0,148	24,2	4,8	0,234
	ne	29,0	41,9		66,1	4,8	
Br.HT:	0	1,6	8,1	0,298	9,7	0,0	0,611
	1-3	40,3	40,3		72,6	8,1	
	4-10	4,8	4,8		8,1	1,6	
Le (x10 <sup>9</sup> ):	< 40	38,7	33,9	0,239	62,9	9,7	0,285
	41-80	6,5	16,1		22,6	0,0	
	> 81	1,6	3,2		4,8	0,0	
CD34 <sup>+</sup> pop. (%):	0-40	38,7	33,9	0,239	62,9	9,7	0,285
	41-80	6,5	16,1		22,6	0,0	
	> 80	1,6	3,2		4,8	0,0	
CD34 <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> kg/TM):	< 2,6	47,8	49,2	0,235	86,9	9,8	0,187
	> 2,6	0,0	3,0		3,3	0,0	
CD34 <sup>+</sup> (ćelija/ $\mu$ L)	< 200	46,8	48,4	0,083	85,5	4,6	0,509
	> 200	0,0	4,8		4,8	0,0	
D.mob.:	5-9	41,9	45,2	0,839	77,4	9,7	0,611
	11-16	1,6	3,2		4,8	0,0	
	17-22	3,2	4,8		8,1	0,0	
Th odgovor:	KR, VDPR	13,8	25,9	0,212	36,2	3,4	0,738
	PR, SB, PB, RB	31,0	29,3		53,4	6,9	

je da se MM javlja u starijoj populaciji u odnosu na limfome. U poređenju sa dosadašnjim saznanjima iz literature, oboleli od MM obuhvaćeni ovom studijom bili su oko 15 godina mlađi (13, 14). Starost obolelih od limfoma bila je saglasna sa podacima iz literature (5, 15). Iako je ispitivana starost bolesnika kao mogući faktor koji bi uticao na prve znakove ranog oporavka ćelija koštane srži, ona nije bila od značaja u ovoj studiji. Odsustvo bilo kakve korelacije između starosti i ranog oporavka ANC500\_11 i PLT20\_13 može se objasniti velikim starosnim rasponom koji dovodi do disperzije međusobne povezanosti upoređenih varijabli, što nije prevaziđeno ni kada je izvršeno rangiranje na starije i mlađe od 50 godina. U drugim studijama značaj doze CD34<sup>+</sup> ćelija u postizanju ranog oporavka ANC500\_11 i PLT20\_13 ispostavio se kao veliki, suprotstavljajući se rezultatima dobijenim iz ove studije (20). Neke studije su iznale zaključke da bi možda veća doza CD34<sup>+</sup> ćelija dovela do boljeg kliničkog oporavka (16, 17). Kasniji oporavak ANC500 i PLT20 sledstveno dovodi do recipročnog kasnijeg kliničkog oporavka, povećavajući stopu mogućih komplikacija i veće troškove lečenja usled produžene hospitalizacije. Iako je pokazano da zavidan broj bolesnika postiže oporavak PLT20 u očekivanom roku, rezultati nisu imali statističku značajnost.

Prihvaćena je nulta hipoteza da nema razlike između tzv. "steady-state" mobilizacione grupe bolesnika i grupe koja je prethodno primila hemioterapiju u pogledu kraće mobilizacije ili bržeg uspostavljenja engraftmenta ( $p > 0,05$ ). U ovom uzorku je samo 14 bolesnika mobilisano u "steady-state" uslovima, što se smatra malom grupom za upoređivanje. Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama koje su takođe pokazale da kod mobilizacija izvedenih u uslovima "steady-state" i onih nakon primenjene hemioterapije nema statističke razlike u kvalitetu afereznog CD34<sup>+</sup> ćelijskom proizvodu (18). Kod većine mobilisanih (78%) može se obezbediti minimalan prinos CD34<sup>+</sup> ćelija ( $\geq 2,0 \times 10^6$ /kg TM) već pri prvom pokušaju ( $p < 0,047$ ). Moguće objašnjenje je da bolesnici imaju najbolji kapacitet koštane srži pri prvoj primeni mobilizacionog protokola, dok pri svakom sledećem pokušaju opada ćelijski potencijal koštane srži, samim tim i prinos CD34<sup>+</sup> ćelija pri aferezi. Smanjenje kvaliteta afereznog proizvoda u direktnoj je vezi sa dužim trajanjem mobilizacije ( $p = 0,01$ ), što dovodi do zaključka da produženo trajanje mobilizacije umnogome doprinosi smanjenom ćelijskom prinosu.



Ograničenja ove studije bila su uporedna posmatranja tri dijagnoze sa svim parametrima od značaja, kao i mali broj "steady-state" mobilizacija koje su neophodne za detaljnije upoređivanje. Takođe, u ovoj studiji nisu uzete u obzir vijabilnosti CD34<sup>+</sup> ćelija nakon odmrzavanja afereznog proizvoda, kao ni uticaj primenjenih kondicionih režima, što bi mogao biti sledeći korak u daljim istraživanjima.

## Zaključak

Zadovoljavajući CD34<sup>+</sup> ćelijski prinos može se obezbediti u prvom mobilizacionom pokušaju, a kasnije prikupljanje može se postići uz primenu pleriksafora. Neophodno je uključiti veći broj "steady-state" mobilizacija. Pad kvaliteta afereznog proizvoda u direktnoj je vezi sa dužim trajanjem mobilizacije. S druge strane, niz parametara kao što su pol, starosna dob, lečenje radioterapijom i hemioterapijom, nivo leukocita, dužina mobilizacije, nivo CD34<sup>+</sup> ćelija u afereznom proizvodu, kao i terapijski odgovor, nemaju uticaja na ANC500\_11 i PLT20\_13. Neuspeh mobilizacije kod izvesnog broja pacijenata i dalje, međutim, predstavlja problem. Teži se daljem unapređivanju optimalne strategije koja bi povećala efikasnost procesa mobilizacije.

## Literatura

1. Milani P, Palladini G, Merlini G. Serum-free light-chain analysis in diagnosis and management of multiple myeloma and related conditions. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2016;245: S113-8.
2. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji, Registar za rak u Centralnoj Srbiji ISBN 86-7358-030-7 izveštaj broj 16.
3. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer. 1975Sep;36(3):842-54.
4. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011 May12;117(19):5019-32.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016 19;127(20):2375-90.
6. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res. 1971Nov;31(11):1860-1.
7. Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood. 1998Jun 15;91(12):4523-30.
8. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immunol. 2002Jul;3(7):687-94.
9. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J Exp Med. 2005 Apr18;201(8):1307-18.
10. Hosing C, Saliba RM, Ahlawat S, Körbling M, Kebriaei P, Alousi A, et al. Poor hematopoietic stem cell mobilizers: A single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma. Am J Hematol. 2009Jun;84(6):335-7.
11. Moreb JS, Salmasinia D, Hsu J, Hou W, Cline C, Rosenau E. Long-Term Outcome after Autologous Stem Cell Transplantation with Adequate Peripheral Blood Stem Cell Mobilization Using Plerixafor and G-CSF in Poor Mobilizer Lymphoma and Myeloma Patients. Adv Hematol. 2011;2011: 517561.
12. Beyer J, Schwella N, Zingsem J, Strohscheer I, Schwane I, Oettle H, et al. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1995 Jun;13(6):1328-35.
13. Kyle RA, Finkelstein S, Elveback LR, Kurland LT. Incidence of monoclonal proteins in a Minnesota community with a cluster of multiple myeloma. Blood. 1972Nov;40(5):719-24.
14. Saleun JP, Vicariot M, Deroff P, Morin JF. Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistère, France. J Clin Pathol. 1982Jan;35(1):63-8.
15. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. Cancer. 1982 May15;49(10):2112-35.
16. Yoon DH, Sohn BS, Jang G, Kim EK, Kang BW, Kim C, et al. Higher infused CD34+ hematopoietic stem cell dose correlates with earlier lymphocyte recovery and better clinical outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. Transfusion (Paris). 2009Sep;49(9):1890-900.
17. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. Blood. 2002 Apr15;99(8):2726-33.
18. Yüksel MK, Tekgündüz E, Sönmez C, Topcuoglu P, Yurtcu A, Demiriz I, et al. A feasible shortcut for the mobilization outcome: Steady state CD34 positive hematopoietic stem cells. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis. 2012 Aug;47(1):67-7