

Результаты мобилизации, афереза и аутореинфузии гемопоэтических стволовых клеток у детей с нейробластомой: роль мониторинга количества CD34+ клеток в периферической крови

Е.Е. Курникова, И.Б. Кумукова, И.В. Гуз, Р.Д. Хисматуллина, Т.В. Шаманская, М.С. Фадеева, С.Ю. Глушкова, В.В. Бриллиантова, С.Р. Варфоломеева, П.Е. Трахтман

ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Курникова Елена Евгеньевна – врач-трансфузиолог, отделение трансфузиологии, заготовки и процессинга ГСК Национального научно-практического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 5223
elena.kurnikova@fccho-moscow.ru

Миелоаблативная химиотерапия, сопровождающаяся аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, способна улучшить результаты долгосрочной выживаемости пациентов с нейробластомой группы высокого риска, но требует достаточного количества аутологичных периферических стволовых клеток крови. Выполнено 118 аферезов для 116 детей с нейробластомой группы высокого риска. Медиана возраста – 2 года 10 мес. (от 6 мес. до 13 лет), медиана массы тела – 13 кг (от 5,8 до 47 кг). Мобилизация гранулоцитарным колониестимулирующим фактором в дозе 10 мкг/кг инициировалась в момент начинающегося восстановления кроветворения после последнего блока химиотерапии; мониторинг CD34+ клеток в периферической крови проводили с 3-го дня от начала мобилизации. Аферез выполняли на следующий день после достижения количества CD34+ клеток >15 в мкл после четырех дней мобилизации. Модификация тактики мобилизации, основанная на данных мониторинга числа CD34+ клеток в ПК, позволила достичь ко дню афереза медианы числа CD34+ клеток 105,27 клеток/мкл (от 14,8 до 714,8). В продукте афереза медиана CD34+/кг составила $14,43 \times 10^6/\text{кг}$ (от 2,68 до 74). Были выявлены достоверная корреляция между дозой CD34+/кг в продукте афереза и уровнем CD34+ клеток в ПК в день афереза ($R=0,762$; $p<0,0001$), снижение результатов мобилизации и аферезов, если проведено более трех блоков ХТ. Благодаря мониторингу количества циркулирующих в ПК CD34+ клеток и модификации тактики мобилизации стала выполнимой задача сбора адекватной дозы CD34+ клеток за одну процедуру афереза: для 88 (75,86%) из 116 пациентов собрано $10 \times 10^6/\text{кг}$ CD34+ клеток и более, для 100% пациентов – более $2,5 \times 10^6/\text{кг}$ CD34+ за один аферез.

Ключевые слова: периферические стволовые клетки, мобилизация, аферез, лейкоаферез, нейробластома, пликсафор.

DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-28-39

Results of mobilization, apheresis and autoreinfusion of hematopoietic stem cells in children with neuroblastoma: role of monitoring the count of CD34+ cells in peripheral blood

E.E. Kurnikova, I.B. Kumukova, I.V. Guz, R.D. Chismatullina, T.V. Shamanskaya, M.S. Fadeeva, S.Y. Glushkova, V.V. Brilliantova, S.R. Varfolomeyeva, P.E. Trakhtman

National Research Practice Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, Russian Federation

Correspondence:

Elena E. Kurnikova, MD, Department of Transfusion medicine, National Research Practice Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitry Rogachev. Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 5223
elena.kurnikova@fccho-moscow.ru

Myeloablative chemotherapy with autologous hematopoietic stem cells transplantation, can improve the results of long-term survival in patients with high-risk neuroblastoma. This treatment requires a sufficient number of autologous peripheral blood stem cells. Methods: 118 apheresis procedures was completed for 116 children with high-risk neuroblastoma, the median age was 2 years and 10 months (range, 6 months to 13 years), median body weight of 13 kg (range, 5.8 to 47 kg). Mobilization with G-CSF at a dose of 10 mg/kg was initiated at the time of incipient recovery of hematopoiesis after the last cycle of chemotherapy, monitoring of CD34+ cells in peripheral blood were started on 3rd day from the beginning of mobilization. Apheresis was performed the following day after reaching the number of CD34+ cells >15 cells/ μl after 4 consequent days of mobilization. Results: Modification of mobilization, based on CD34+ cells monitoring data, allowed us to reach the median number of CD34+ cells of 105,27 cells/ μl (range, 14.8–714.8) at the day of apheresis. The median number of collected CD34+/kg was $14,43 \times 10^6/\text{kg}$ b.w. (range, 2.68–74). Was revealed a significant correlation between the dose of CD34+/kg b.w in the apheresis product and the level of CD34+ cells in peripheral blood at the day of apheresis ($R=0.762$; $p<0.0001$) and decrease of the results of mobilizing results and apheresis efficiency if mobilization was initiated later than after the 3rd course of chemotherapy. Conclusion: By monitoring the number of circulating CD34+ cells in peripheral blood and modification of mobilization tactic, the task to collect an adequate dose of CD34+ cells for autoSCT with one apheresis procedure was feasible. In 88 (75.86%) of the 116 patients we were able to collect $10 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ cells and more, and 100% of patients collected $> 2.5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ cells with 1 apheresis. **Key words:** peripheral blood stem cells, stem cell mobilization, apheresis, neuroblastoma, plerixafor.

Нейробластома – самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей раннего возраста, относится к семейству периферических нейрогенных опухолей (ПНО), происходит из эмбриональных нейроэктодермальных клеток. Нейробластома отличается разнообразием клинического поведения – от спонтанной регрессии до устойчивости к проводимой химиотерапии [1, 2]. Выбор индивидуальной тактики терапии основан на внедрении риск-адаптированного подхода. В рамках современных риск-адаптированных протоколов терапии пациентов с нейробластомой стратифицируют на три группы риска с использованием ряда прогностических факторов. Стратификационные критерии включают: возраст пациента на момент постановки диагноза, стадию заболевания (*International Neuroblastoma Staging System* – INSS), наличие амплификации протоонкогена MYCN, делецию короткого плеча 1 хромосомы (1p), делецию длинного плеча 11 хромосомы (11q), гистологический тип опухоли (*International Neuroblastoma Pathology Classification* – INPC) [3]. Приблизительно 40% пациентов, у которых впервые диагностирована нейробластома, принадлежат к группе высокого риска – это пациенты с метастатической формой заболевания (IV стадия, около половины всех случаев) старше 1 года и пациенты любого возраста с амплификацией гена MYCN независимо от стадии заболевания [3–7].

Стандартный подход, применяемый для лечения нейробластомы высокого риска, включает: индукционную химиотерапию (ХТ), локальный контроль (хирургическое удаление опухоли), дистанционную лучевую терапию, радио-таргетную терапию метайодбензилгуанидином (МЙБГ), меченым I-131, консолидационную миелоаблативную ХТ и терапию минимальной остаточной болезни (МОБ) 13-цис-ретиноевой кислотой [3, 8–10].

Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови (АутоТГСК), сопровождающая высокодозную химиотерапию, – важный компонент современных протоколов терапии нейробластомы группы высокого риска. Согласно современным требованиям, предпочтительно обеспечить сбор достаточного количества периферических стволовых клеток крови (ПСКК) для пациентов с нейробластомой в момент первой попытки афереза как для АутоТГСК, сопровождающей высокодозную ХТ, так и для противорецидивной терапии, которая может потребовать поддержку ПСКК [11]. Цель проведения успешного афереза у детей – сбор достаточного количества ПСКК за минимальное число процедур. Чаще всего для мобилизации ГСК применяют гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), который назначают после завершения блока химиотерапии [12]. На эффективность мобилизации ГСК

могут оказать влияние количество проведенных ранее блоков ХТ, режим мобилизации, правильно выбранный день начала мобилизации и лейкоафереза. Тем не менее существует некий пул пациентов, у которых не удается получить достаточное число CD34+ клеток в периферической крови (ПК) перед аферезом при использовании ГКСФ. Дополнительным препаратом для стимуляции у таких пациентов стал плериксафор (AMD3100) – селективный обратимый антагонист CXCR4 хемокинового рецептора, блокирующий его за счет связывания с когнатным лигандом, фактором стромальных клеток- α (SDF- α). Ингибирование связи между CXCR4 и SDF- α приводит к выбросу из костного мозга в системный кровоток как зрелых, так и полипотентных клеток [13–16]. Быстрые сроки восстановления собственного кроветворения после проведения АутоТГСК позволяют снизить токсичность АутоТГСК, связанную с развитием инфекционных осложнений.

Цель работы: анализ эффективности выбранной стратегии мобилизации, аферезов и последующей аутореинфузии ПСКК у детей с нейробластомой высокого риска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретроспективный анализ результатов мобилизации и аферезов ПСКК для обеспечения этапа консолидации с АутоТГСК за период с марта 2012 по июнь 2016 года включительно, выполненных в ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. В исследование были включены все пациенты с нейробластомой высокого риска, которым в рамках протокола лечения предусматривалось проведение высокодозной ХТ с последующей АутоТГСК, в том числе трое пациентов с рефрактерным течением заболевания, двое – с рецидивом после проведения ХТ и один пациент с поздним рецидивом после АутоТГСК.

Пациентов стратифицировали на группы риска. Они получали терапию по модифицированному протоколу Немецкой группы по лечению нейробластомы NB-2004 [7]. Стандартная индукционная терапия включала шесть блоков ХТ: чередование блоков N5 и N6 – для детей старше 6 мес.; блоки N4 – для детей младше 6 мес. с последующим переходом на блоки N5 и N6 по достижении возраста 6 мес. Состав блоков химиотерапии представлен в *таблице 1*. Тем пациентам, у которых ответ на стандартные 6 курсов индукционной терапии оценивали как «частичный», «смешанный» и «стабилизация», при отсутствии признаков прогрессирования проводили терапию по схеме N8, направленную на улучшение ответа перед АутоТГСК. Контроль поражения костного мозга выполняли после проведения двух индукционных блоков. Мобилизация ПСКК инициировалась в подавляющем большин-

стве случаев после 3-го блока ХТ на фоне достигнутой санации костного мозга от опухолевых клеток. Если после двух блоков ХТ санация костного мозга не была достигнута, то контроль миелограммы проводили после каждого последующего блока до момента ее достижения. Вторичное хирургическое лечение проводили после 4-го или 6-го блока ХТ; 131-И-МЙБГ терапию пациентам с активной резидуальной опухолью, по данным сцинтиграфии с МЙБГ, назначали после завершения индукционной ХТ перед АутоТГСК (с июля 2014 года).

В исследовании принимали участие 116 пациентов, из них 61 мальчик и 55 девочек. Медиана возраста пациентов – 2 года 10 мес. (от 6 мес. до 13 лет). Медиана массы тела – 13 кг (от 5,8 до 47 кг). Медиана объема циркулирующей крови (ОЦК) – 1050 мл (от 580 до 3735 мл). Характеристики пациентов представлены в таблице 2.

Мобилизация. Для мобилизации ГСК использовали гранулоцитарные колониестимулирующие факторы (ГКСФ): ленограстим (Граноцит, Шугаи Санофи-Авентис, Санофи Винтроп Инд., Франция), филграстим (Лейкостим, ЗАО «Биокад», Россия; Теваграстим, Тева Фармацевтические предприятия Лтд., Израиль). У большинства пациентов мобилизация ГСК началась во время восстановления лейкопоза после проведенного блока ХТ согласно протоколу терапии. Критерии начала мобилизации: число лейкоцитов периферической крови $> 1 \times 10^6/\text{мл}$; нейтрофилов $\geq 0,35 \times 10^6/\text{мл}$; +/- восстановление до нормальных значений или самостоятельный прирост числа тромбоцитов $> 20 \times 10^6/\text{мл}$.

Стандартную мобилизацию проводили ГКСФ в дозе 10 мкг/кг/сут., 4–5 дней; последнюю дозу вво-

дили за 2–4 часа до начала афереза. Контроль числа CD34+ в периферической крови начинали на 3-й или 4-й день от начала стимуляции ГКСФ (после двух или трех введений препарата), последний контроль – в день афереза. В случае низкого содержания CD34+ (< 10 клеток/мкл) дозу ГКСФ увеличивали до 20 мкг/кг/сут. Если к 4–5-му дню от начала мобилизации количество CD34+ в ПК было менее 15/мкл, но более 5/мкл, то за 10 часов до планируемого афереза вводили плериксафор (Мозобаил, Джензайм Лтд, Великобритания). Термин «хорошие мобилизаторы» мы использовали, если количество CD34+ клеток в крови накануне дня афереза у пациента было > 15 клеток/мкл; «плохие мобилизаторы» – если количество CD34+ клеток в крови в день накануне афереза < 15 . Увеличение дозы ГКСФ до 20 мкг/кг/сут. допускали и среди «хороших мобилизаторов», если число лейкоцитов накануне афереза было значительно меньше $10 \times 10^6/\text{мл}$. Минимальным достаточным для проведения афереза ГСК считалось количество CD34+, равное 20 клеток/мкл, лейкоцитов – $10 \times 10^6/\text{мл}$ и более.

Аферезы ГСК. Лейкаферезы выполняли с применением программы сбора моноклеаров на сепараторах *Spectra Optia*, программное обеспечение версий 6 и 9 (*Caridian BCT Inc, Lakewood, CO, USA*) и Cobe Spectra, программное обеспечение версия 6.1 (*Caridian BCT Inc, Lakewood, CO, USA*).

Аферез планировали на следующий день после достижения достаточного числа CD34+ клеток в ПК. Накануне афереза, если это было необходимо, устанавливали дополнительный центральный венозный катетер (ЦВК).

Для детей до 3 лет и/или с массой тела ≤ 15 кг экстракорпоральный контур сепаратора клеток кро-

Таблица 1

Химиотерапевтические препараты, входящие в состав блоков N4, N5, N6, N8

Блок	ХТ препараты и дозы, возраст 6 мес. и старше	ХТ препараты и дозы, возраст < 6 мес.	Дни
N4		Доксорубин 0,5 мг/кг	1, 3, 5
		Винкристин 0,025 мг/кг	1, 3, 5
		Циклофосфамид 10 мг/кг	1–7
N5	Цисплатина 40 мг/м ²	Цисплатина 1,3 мг/кг	1–4
	Этопозид 100 мг/м ²	Этопозид 4,2 мг/кг	1–4
	Виндестин 3 мг/м ²	Виндестин 0,1 мг/кг	1
N6	Винкристин 1,5 мг/м ²	Винкристин 0,05 мг/кг	1 и 8
	Дакарбазин 200 мг/м ²	Дакарбазин 6,7 мг/кг	1–5
	Ифосфомид 1500 мг/м ²	Ифосфомид 50 мг/кг	1–5
	Доксорубин 30 мг/м ²	Доксорубин 1 мг/кг	6 и 7
N8	Топотекан 1 мг/м ²		1–7
	Циклофосфамид 100 мг/м ²		1–7
	Этопозид 100 мг/м ²		8–10

ви обязательно заполняли одной единицей донорской, облученной в дозе 25 Гр, лейкофильтрованной эритроцитной взвеси с целью профилактики гиповолемических осложнений.

Минимальное допустимое количество тромбоцитов перед аферезом составляло $50 \times 10^6/\text{мл}$; концентрация гемоглобина для аферезов с заполнением контура сепаратора эритроцитной взвесью – более 90 г/л, без заполнения – более 110 г/л.

Целевое количество клеток для успешной аутологичной трансплантации – $5 \times 10^6/\text{кг}$ CD34+ и $3 \times 10^8/\text{кг}$ нуклеарных клеток (*nuclear cells, NC*). Субоптимальное количество CD34+ для каждой трансплантации – $2\text{--}4 \times 10^6/\text{кг}$. Достаточным количеством CD34+ клеток после мобилизации с плериксафором считалось $3 \times 10^6/\text{кг}$. Если эффективность мобилизации была достаточной, и не возникало никаких технических или клинических препятствий, то для всех пациентов с нейробластомой выполняли сбор клеток в количестве, достаточном для двух этапов клеточной поддержки за один аферез (то есть $\text{CD34+} \geq 10 \times 10^6/\text{кг}$ и $\text{NC}/\text{кг} \geq 6 \times 10^8/\text{кг}$).

В зависимости от продолжительности мы разделили аферезы на группы: стандартный аферез (*standard volume leukapheresis, SVL*) – до 220 мин, не более 2,0 обработанных ОЦК; средний аферез (*medium volume leukapheresis, MVL*) – 221–320 мин и/или 2,1–2,99 обработанных ОЦК; большеобъемный аферез (*large volume leukapheresis, LVL*) – 321–480 мин и/или 3,0–4,99 обработанных ОЦК; экстра большеобъемный аферез (*extra large volume leukapheresis, XLVL*) – более 480 мин и/или от 5,0 обработанных ОЦК.

Аликвоты продукта афереза по 0,5 мл направляли в лабораторию для определения наличия ампли-

фикации гена MYCN методом полимеразной цепной реакции.

Лабораторные методы. Для определения количества CD34+ стволовых клеток в образцах ПК и продукте афереза в нашем Центре используется протокол исследования ISHAGE (*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*) [17]. Абсолютное количество CD34+ клеток вычисляли двухплатформенным методом: умножением процентного значения количества стволовых клеток и абсолютного количества лейкоцитов, полученных на проточном цитометре (*BD FACS Canto TM II, Becton-Dickinson, New Jersey, USA*) и гематологическом анализаторе (*Sysmex XS800i, SYSMEX Corporation, Kobe, Japan*). Количество гемопоэтических стволовых клеток определяли по экспрессии мембранных маркеров CD34 и CD45 (*CD – cluster of differentiations*) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами, мечеными фикоэритрином (PE) и флуоресцинизиотиоцианитом (FITC) (*Becton-Dickinson, New Jersey, USA*). Окрашивание первично мечеными МкАТ выполняли согласно инструкции производителя. После инкубации клеток с антителами в суспензию добавляли раствор, лизирующий эритроциты (*FACS PharmLyse, BD*), затем отмывали фосфатно-солевым буфером (*Cell Wash, BD*).

Расчет эффективности сбора (*collection efficiency, CE*). Мы не измеряли количество CD34+ клеток в ПК после завершения афереза, поэтому для оценки эффективности сбора CD34+ клеток использовали показатель CE2, вычисленный по описанной ранее формуле [18, 19]:

$$\text{CE2 (\%)} = \frac{(\text{CD34+}/\text{мл продукта} \times V \text{ продукта})}{(\text{CD34+ до афереза} \times \text{обработанный объем крови})}$$

Статистический анализ выполнен с применением программы XLSTAT 2016. Для графического отображения распределения данных между группами использовали диаграммы размаха (*box plot*). Для выявления взаимосвязей между параметрами применялся ковариационно-корреляционный анализ на основе теста Пирсона и линейный регрессионный анализ. Для оценки различий между двумя группами использовали критерий Манна-Уитни. Результат считали достоверным, если *p-value* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего за указанный период в нашем Центре было предпринято 125 попыток мобилизации для 116 пациентов с нейробластомой высокого риска; выполнено 118 аферезов ГСК (два афереза – повторные). В анализ мы включили 116 первых аферезов ГСК.

Таблица 2

Основные характеристики пациентов

Характеристики	
Всего	n=116
Пол (мальчики/девочки)	61/55
Возраст	
Медиана (минимум–максимум)	2 года 10 мес. (5 мес.– 7 лет)
Масса тела, кг	
Медиана (минимум–максимум)	13,0 (5,8–47)
< 9	11 (9,48%)
9–15	77 (66,37%)
15,1–19	19 (16,37%)
≥ 20	9 (7,75%)
ОЦК, мл	
Медиана (минимум–максимум)	1050 (580–3735)

У 7 (6%) пациентов аферез ГСК состоялся после второй попытки мобилизации; у 1 (0,86%) – с третьей попытки. У пяти из этих пациентов первая попытка мобилизации была unsuccessful, у одного пациента аферез был отменен из-за развития пневмонии, у одного – из-за серьезного осложнения катетеризации (травма левой внутренней яремной вены), у одного пациента первый аферез не состоялся из-за клинически значимой токсичности ГКСФ, а вторая попытка была неэффективной. Количество CD34+ клеток в ПК в случаях неэффективной мобилизации достигло максимум (1,3 клеток/мкл) после 4–5 дней стимуляции.

У 4 (3,44%) детей мобилизация и аферез состоялись после двух блоков индукционной ХТ; у 51 (43,96%) – после трех блоков; у 15 (12,93%) – после четырех блоков; у 33 (28,44%) – после пяти; у 7 (6,03%) детей – после шести блоков; у 4 (3,44%) – после семи блоков; по 1 (0,86%) ребенку – после восьми и девяти блоков ХТ. Медиана количества проведенных блоков перед состоявшимся аферезом – 4 (от 2 до 9).

Блок N4 предшествовал мобилизации у 4 детей 5–6 мес. жизни; блок N5 – в 84 случаях; блок N6 – в 22 случаях и блок N8 – в 6 случаях. Медиана интервала от начала блока до старта мобилизации ГСК – 19 дней (от 9 до 26 дней); от окончания блока ХТ до начала мобилизации – 14 дней (от 5 до 22 дней). Одному ребенку мобилизация была начата на *steady state* (31-й день блока, 27 дней после окончания ХТ).

Мобилизация ГСК стандартной дозой ГКСФ 10 мкг/кг/сут. была проведена 83 пациентам, у 68 из которых уровень CD34+ более 20 клеток/мкл был отмечен уже в день первого контроля.

Мобилизация ГСК с увеличением дозы ГКСФ до 20 мкг/кг была проведена 22 детям. Среди них 10 детей не были «плохими мобилизаторами»: содержание CD34+ в ПК в день первого контроля было хорошим (медиана 46 кл/мкл; от 13 до 167 кл/мкл), но количество лейкоцитов менее 10 (медиана $3,72 \times 10^6$ /мл; от 1,56 до 7,82), поэтому накануне афереза назначали дополнительное введение ГКСФ. В день первого контроля CD34+ 12 детей имели довольно низкое содержание CD34+ клеток в ПК: медиана – 4 клетки/мкл (от 0 до 11 клеток/мкл); медиана уровня лейкоцитов – $3,25 \times 10^6$ /мл (от 0,58 до 15,06). Этим пациентам удалось достичь достаточного уровня CD34+ клеток в ПК к 4–6-му дню от начала мобилизации (медиана – 26 клеток/мкл; от 13 до 73) только за счет увеличения дозы ГКСФ в два раза, введение плериксафора не потребовалось.

Дополнительное назначение плериксафора перед первым аферезом из-за низкого содержания CD34+ клеток в ПК потребовалось 11 пациентам. Только у троих из них не предпринимали попытки достичь опти-

мального числа CD34+ за счет увеличения дозы ГКСФ до 20 мкг/кг/сут. Медиана количества CD34+ клеток накануне афереза перед введением плериксафора составила 10 клеток/мкл (от 4 до 19 клеток/мкл).

Двоим пациентам потребовался повторный аферез: одному – из группы стандартной мобилизации (моноГКСФ 10 мкг/кг/сут.) и одному – из группы с дополнительным введением плериксафора. За один аферез для них было получено соответственно $4,4 \times 10^6$ /кг и $6,8 \times 10^6$ /кг CD34+ клеток. Число CD34+ в день повторного афереза составило соответственно 42/мкл и 19/мкл, что в обоих случаях в 1,5 раза меньше, чем в день первого афереза.

В общей группе пациентов медиана числа CD34+ клеток накануне афереза составляла 45 кл/мкл (4–530 кл/мкл). Медиана количества CD34+ клеток в день первого афереза – 105 клеток/мкл (15–715 клеток/мкл), лейкоцитов – $18,26 \times 10^6$ /мл (1,7–59,5), процентного содержания CD34+ – 0,75% (0,05–6,9%), тромбоцитов – 183×10^6 /мл (44–708), гематокрита – 30% (22,5–42,7%), гемоглобина – 106 г/л (81–146 г/л).

Результаты динамического мониторинга количества CD34+ клеток в ПК среди пациентов групп, различающихся по стратегии мобилизации, представлены в таблице 3.

Десять аферезов из 116 выполнены на сепараторе *Cobe Spectra*, остальные 108 – на *Spectra Optia*; 88 (75,86%) аферезов ГСК проведены с заполнением контура эритроцитарной взвесью. Медиана гематокрита эрвзвеси, использованной для заполнения, – 54,6% (30,1–78%). В зависимости от антропометрических показателей пациентов и уровня гемоглобина до афереза части пациентов после завершения афереза ГСК производили полный или частичный возврат крови. Частичный возврат крови выполнен 29 (32,95%) пациентам, полный возврат – 3 (3,4%); 56 (63,63%) пациентам возврат крови не проводили.

Минимальное число тромбоцитов в крови после афереза составило 29×10^6 /мл (медиана 118×10^6 /мл), минимальная концентрация гемоглобина – 88 г/л (медиана 112 г/л). Трансфузия тромбоцитарного концентрата перед удалением дополнительного ЦВК потребовалась пятерым детям. Аллергическая реакция на использованную для заполнения контура донорскую эритроцитную взвесь наблюдалась у одного ребенка (покраснение кожных покровов). У одного ребенка отмечена вероятная цитратная токсичность (гипокальциемия не документирована).

В продукте афереза количество клеток на 1 кг массы тела пациента составило: медиана NC/kg – $11,92 \times 10^8$ /кг (от 2 до 30), медиана CD34+/кг – 14,4 (от 2,7 до 74). Медиана абсолютного количества CD34+ в продукте афереза – 179×10^6 (от 41,95 до 3451). Медиана эффективности афереза (CE2) – 63,35% (от 25,6 до 111,4). Менее 5×10^6 /кг CD34+ клеток за один

аферез ГСК было набрано у семи детей: одному из них на следующий день выполнили повторный аферез, у остальных шести пациентов полученный результат был признан удовлетворительным – у пяти из них мобилизацию проводили с применением плериксафора. Сбор $10 \times 10^6/\text{кг}$ CD34+ клеток и более за один аферез был возможен для 88 из 116 (75,86%) пациентов.

В таблице 3 представлены данные о количестве CD34+ клеток на разных этапах контроля в зависимости от длительности мобилизации до старта афереза, объема/продолжительности афереза и дозы CD34+ клеток в полученном продукте. Все данные разбиты по группам в соответствии с тактикой мобилизации.

Рисунки 3 и 4 иллюстрируют влияние количества блоков индукционной ХТ, проведенных пациентам с нейробластомой высокого риска до инициации мобилизации, на результаты мобилизации и афереза. Прослеживается четкая корреляция между количеством блоков ХТ и результатами мобилизации и афереза. Дети, которым проведено более трех блоков до старта мобилизации, показали худшие результаты (коэффициент регрессии для числа CD34+ клеток в день афереза равен -35; для абсолютного содержания CD34+ клеток в продукте афереза – -86). Если разделить всех пациентов на две группы (в первой – 55 пациентов, которым проведено до трех блоков ХТ; во второй – 61 пациент, каждому выполнено более трех блоков ХТ) и провести непараметрическое сравнение этих групп с применением критерия Манна–Уитни, то различия, полученные между этими группами, достоверны: для числа CD34+ клеток в день первого контроля $p < 0,015$; для числа CD34+ накануне афереза $p < 0,034$;

для прироста числа CD34+ клеток ко дню афереза, числа CD34+ клеток в день афереза и содержания CD34+ клеток в продукте афереза $p < 0,0001$.

Побочные эффекты. Мы столкнулись с относительно небольшим количеством побочных эффектов: токсичность мобилизации ГКСФ была отмечена у одного пациента в виде постоянной тошноты и многократной рвоты. Побочных эффектов, связанных с введением плериксафора, не выявлено. Зафиксировано шесть событий, связанных с установкой ЦВК: травма внутренней яремной вены – 1, неоднократная пункция сосуда с образованием гематомы – 1; небольшое кровотечение из места венопункции – 4. У одного пациента отмечена аллергическая реакция на компоненты крови – эритема кожных покровов (купирована введением антигистаминного препарата). Вероятная цитратная токсичность выявлена у одной пациентки в виде однократной тошноты и рвоты, возникшей на 200-й минуте афереза, после снижения скорости введения ACD-A (снижения скорости забора) реакция не повторялась.

Проблемы с давлением забора в процессе афереза, связанные с положением катетера или образованием сгустков в линии забора, строго не учитывались, однако, несмотря на то что эти случаи не были единичными, ни разу такие проблемы не стали причиной прерывания афереза.

Снижение числа тромбоцитов после афереза не было клинически значимым. Трансфузии тромбоконцентрата после афереза перед удалением бедренного катетера потребовались пяти пациентам.

Не было зафиксировано ни одного случая клинически значимого снижения концентрации гемогло-

Таблица 3

Число лейкоцитов и CD34+ клеток в периферической крови накануне и в день афереза

Показатель	n	CD34+ кл/мкл			День афереза от начала мобилизации						Тип афереза в зависимости от продолжительности и объема				Доза CD34+ (10 ⁶ /кг) в продукте афереза
		1-й контроль	накануне афереза	в день афереза	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	SVA	MVA	LVA	XLVA	
Стандартная мобилизация ГКСФ 10 мкг/кг															
Кол-во пациентов	83				49	27	4	1	1	1	8	39	35	1	
Медиана (min–max)		50 (0,9–530)	59 (14–530)	116 (26–714)											16 (4–74)
Мобилизация с увеличением дозы ГКСФ до 20 мкг/кг, «хорошие мобилизаторы»															
Кол-во пациентов	10				5	5	0	0	0	0	0	8	2	0	
Медиана (min–max)		41 (13–166)	79 (15–342)	153 (48–649)											30,1 (6,4–57)
Мобилизация с увеличением дозы ГКСФ до 20 мкг/кг, «плохие мобилизаторы» к дню 1-го контроля															
Кол-во пациентов	12				0	8	3	1	0	0	0	4	7	1	
Медиана (min–max)		4 (0–11)	26 (13–73)	84 (21–448)											14,08 (3,6–73,4)
Мобилизация ГКСФ (10–20 мкг/кг) + плериксафор (0,24–0,34 мг/кг)															
Кол-во пациентов	11				0	5	3	2	0	0	0	3	6	2	
Медиана (min–max)		3 (0–14)	10 (4–19)	46 (15–147)											5,67 (2,7–13,7)

бина, потребовавшего трансфузий, ни одного случая значимого снижения содержания электролитов в сыворотке крови, гемодинамических нарушений или других серьезных осложнений лейкоферезов.

На наличие амплификации гена *MYCN* исследовано 36 образцов ПСРК тех пациентов, опухоль у которых была *MYCN*-позитивна. Амплификация *MYCN* выявлена в одном образце.

АутоТГСК. Тяжелый соматический статус и невозможность проведения кондиционирования стали причиной отказа от этапа консолидации с АутоТГСК у двух из 116 пациентов, неконтролируемая ХТ прогрессия опухоли – у 18 пациентов.

Миелоаблативная химиотерапия с АутоТГСК была выполнена 96 пациентам из 116. Интервал между завершением введения химиотерапевтических препаратов и инфузией ГСК составил в среднем 48 ч. Состав трансплантатов: доза $NC \times 10^8/kg$ – медиана 6,7 (от 2 до 8), доза $CD34+ \times 10^6/kg$ – медиана 9,37 (от 2,68 до 48). Стимуляция гемопоэза ГКСФ в дозе 5 мкг/кг началась на +5-й день после аутореинфу-

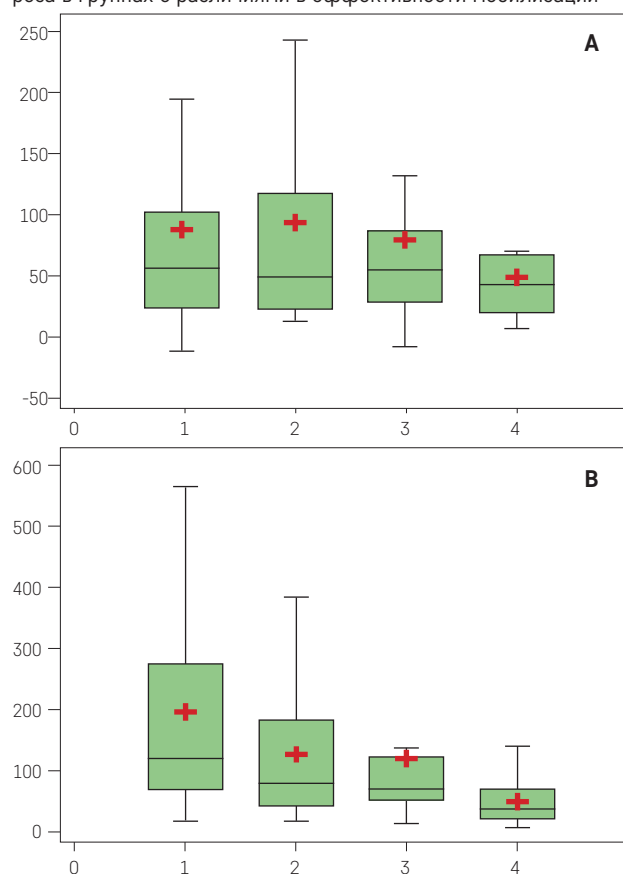
зии ГСК. Приживление трансплантата было достигнуто у 93 пациентов из 96. При этом медиана восстановления нейтрофилов была зафиксирована на +11-й день (от 6 до 19), тромбоцитов – на +15-й день (от 9 до 120). У 14 пациентов тромбоцитарный росток восстановился на +30-й день и позже после АутоТГСК. Достоверной корреляции между дозами перелитых нуклеарных клеток и $CD34+$ клеток и сроками восстановления лейкоцитарного и тромбоцитарного ростков не зафиксировано. Трое пациентов из 96 умерли от инфекционных осложнений в период аплазии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периферические стволовые клетки крови – предпочтительный источник ГСК для АутоТГСК за счет более быстрого восстановления собственного кроветворения относительно костного мозга как источника ГСК. Быстрое восстановление кроветворения связано с меньшим риском развития тяжелых инфекционных

Рисунок 1

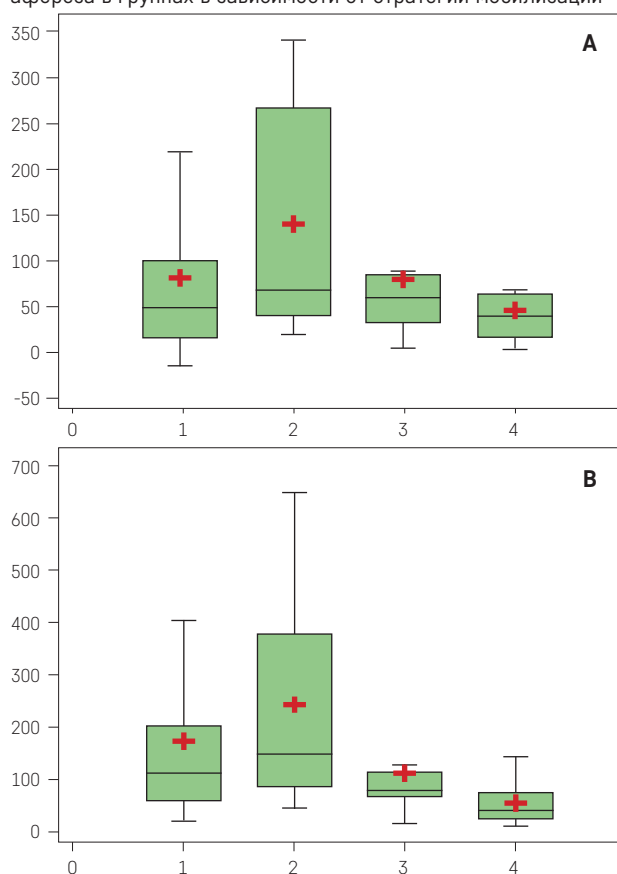
Прирост абсолютного количества $CD34+$ клеток в периферической крови ко дню афереза относительно контроля накануне афереза и непосредственно уровень $CD34+$ клеток в день афереза в группах с различиями в эффективности мобилизации



Примечание: **A** – прирост числа $CD34+$ ко дню афереза относительно предыдущего контроля (клеток/мкл); **B** – число $CD34+$ клеток в день афереза (клеток/мкл). Группы: **1** – число $CD34+$ клеток в первом контроле >20 клеток/мкл (n=68), **2** – число $CD34+$ клеток в первом контроле >10 клеток/мкл (n=14), **3** – число $CD34+$ клеток в первом контроле <10 клеток/мкл (n=23), **4** – назначен плериксафор (n=11).

Рисунок 2

Прирост абсолютного количества $CD34+$ клеток в периферической крови ко дню афереза относительно контроля накануне афереза и число $CD34+$ клеток непосредственно в день афереза в группах в зависимости от стратегии мобилизации



Примечание: **A** – прирост $CD34+$ ко дню афереза относительно предыдущего контроля (клеток/мкл); **B** – число $CD34+$ клеток в день афереза (клеток/мкл). Группы: **1** – моноГКСФ 10 мкг/кг (n=83), **2** – увеличение дозы ГКСФ до 20 мкг/кг, «хорошие мобилизаторы» (n=10), **3** – увеличение дозы ГКСФ до 20 мкг/кг, «плохие мобилизаторы» (n=12), **4** – ГКСФ + плериксафор (n=11).

осложнений, снижением трансфузионной зависимости, сокращением продолжительности госпитализации в стационаре, снижением экономических затрат на проведение АутоТГСК [10, 20].

Оптимизация режимов мобилизации и сбора ПСКК, необходимых для успешной АутоТГСК, – задача многих центров. Назначение ГКСФ после курсов ХТ увеличивает вероятность сбора требуемых доз CD34+ клеток [20, 21]. Увеличение дозы ГКСФ и назначение плериксафора также улучшают результаты мобилизации [21–23]. Значительная предлеченность некоторых пациентов с IV стадией нейробластомы и вовлечение в процесс костного мозга могут негативно отражаться на результатах мобилизации и шансах собрать оптимальные дозы ГСК [24].

В данной работе описан опыт ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, касающийся тактики мобилизации, определения оптимального дня для выполнения афереза, оптимизации процесса афереза ГСК у детей с нейробластомой IV стадии, направленный на сбор оптимального либо минимального количества ГСК за минимальное количество процедур. Доля пациентов с нейробластомой высокого риска составила 46,5% всех пациентов, которым были выполнены аферезы ГСК в нашем Центре. Особенность этих пациентов – их малый возраст и вес.

Проанализировав результаты, полученные за период с марта 2012 по июнь 2016 года включительно, мы можем сказать, что, несмотря на 7% неудачных первых попыток мобилизации, для всех 116 пациентов в итоге удалось собрать требуемое количество ГСК для дальнейшей терапии. При этом у 68 (58,6%) детей уже в первый день контроля числа CD34+ в периферической крови было отмечено достаточное их количество – 20 клеток и выше. Чаще аферез проводили на 5-й день от начала мобилизации.

Мониторинг динамики прироста количества циркулирующих CD34+ клеток в периферической крови начиная с 3-го дня от старта мобилизации позволяет вовремя модифицировать тактику мобилизации за счет увеличения дозы ГКСФ либо добавления плериксафора, которое в таких случаях должно снизить риск неудачи мобилизации до <5% [25]. На *рисунке 1* показано, что определение числа CD34+ клеток в периферической крови имеет предсказательное значение: увеличение в динамике их количества сохраняется от дня первого контроля до дня афереза в разных группах пациентов (группа 1 – >20 клеток при первом контроле; группа 2 – >10 клеток; группа 3 – <10 клеток; группа 4 – <10 клеток, которые не достигли оптимального количества перед аферезом и в итоге потребовали назначения плериксафора). Была выявлена тесная взаимосвязь между числом CD34+ клеток в периферической крови в день афереза и их числом накануне ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,7$), которое в свою очередь тес-

но коррелировало с данными предыдущих измерений ($p < 0,0001$; $R^2 = 0,9$).

Рандомизацию среди пациентов, которым доза ГКСФ была увеличена до 20 мкг/кг/сут., не проводили, но роль увеличения дозы в достижении лучших результатов была показана в других исследованиях [23, 26]. На *рисунке 2* можно проследить динамику прироста уровня CD34+ клеток в ПК в разных группах пациентов именно в зависимости от изменения тактики мобилизации. Максимальный прирост уровня CD34+ отмечен в группе «хороших мобилизаторов», которым доза ГКСФ была увеличена до 20 мкг/кг. Изменение тактики мобилизации в двух группах «плохих мобилизаторов» позволило достичь прироста количества CD34+ клеток со дня накануне афереза к дню афереза, сопоставимого с таковым среди «хороших мобилизаторов», которым проводили стимуляцию в дозе 10 мкг/кг/сут. (медиана прироста – 52 кл/мкл у «хороших мобилизаторов», 63 – у «плохих мобилизаторов» и 42 – в группе «плохих мобилизаторов», которым в дальнейшем назначали плериксафор). Этот скачок прироста CD34+ клеток позволил достичь достаточного их количества во всех группах и выполнить необходимый сбор ГСК у всех нуждающихся пациентов с нейробластомой.

Поскольку клетки опухоли нейробластомы экспрессируют CXCR4, плериксафор потенциально может оказывать клинически значимое воздействие на пациентов с нейробластомой [27, 30]. Некоторые исследователи предполагают, что экспрессия CXCR4 достоверно влияет на развитие метастатического поражения костного мозга у пациентов с нейробластомой, в то время как другие не выявили способности к хемотаксису CXCR4, экспрессирующегося на происходящих из костного мозга метастатических опухолевых клетках [29]. Небольшое исследование, проведенное S. Modak и соавт., показало отсутствие маркеров МОБ в продукте афереза у детей, мобилизация которых была проведена с применением плериксафора, даже если они были выявлены в аспирате костного мозга, взятого перед аферезом [21]. Опубликованы результаты COG (Children's Oncology Group), свидетельствующие о том, что вероятность детекции МОБ в продукте афереза иммунологическими методами крайне мала, даже если она выявлена в костном мозге пациента в это же время [31].

Согласно нашим данным, представленным в *таблице 4*, наиболее значимое влияние на абсолютное содержание CD34+ клеток в продукте афереза и на полученную дозу CD34+ клеток оказывает количество циркулирующих в периферической крови CD34+ накануне и в день афереза. Продолжительность афереза в свою очередь зависит от количества лейкоцитов и CD34+ клеток в периферической крови, целевых значений сбора CD34+ клеток и эффективности

афереза. Грамотное определение необходимой продолжительности афереза, основываясь на полученных лабораторных данных, позволяет достичь целевых значений сбора клеток за один аферез.

Эффективность мобилизации и афереза у пациентов, которым проведено более трех блоков ХТ до старта мобилизации, достоверно хуже (рис. 3, 4). Но, по нашему опыту, эти различия не являются непреодолимой проблемой для детей, которым было проведено даже 7–9 блоков ХТ. К примеру, минимальная доза CD34+ клеток – $2,7 \times 10^6/\text{кг}$ – была собрана у девочки 5 лет после 6 блоков индукционной ХТ; количество CD34+ клеток в периферической крови, равное 21 кл/мкл, было достигнуто к 7-му дню с применением плериксафора; аферез с CE2, равной 29%, продолжался 554 мин, выполняли промежуточное измерение содержания CD34+ клеток в продукте. Данная доза была признана достаточной, и аферезы не повторялись. Восстановление нейтрофильного и тромбоцитарного ростков зафиксировано соответственно на +10-й и +12-й дни после применения полученного продукта афереза для АутоТГСК. Согласно литературным данным, для эффективного восстановления нейтрофильного ростка необходима доза CD34+ клеток $>1 \times 10^6/\text{кг}$. В большинстве центров доза $2\text{--}2,5 \times 10^6/\text{кг}$ считается адекватной. Доза CD34+ клеток, равная $5\text{--}8 \times 10^6/\text{кг}$, ускоряет сроки восстановления нейтрофилов и тромбоцитов, дальнейшая эскалация доз результаты не улучшает [11]. В нашем Центре для всех 116 пациентов с нейро-

бластомой высокого риска удалось собрать более $2,5 \times 10^6/\text{кг}$ CD34+ клеток за один аферез, для 109 (94%) – более $5 \times 10^6/\text{кг}$.

Выявление определяемых количеств минимальной остаточной болезни (МОБ), несомненно, оказывает влияние на выживаемость пациентов с нейробластомой высокого риска [31–35]. Помимо применения биологических агентов с целью воздействия на МОБ, долгое время во многих центрах применялись различные технологии иммуномагнитной очистки продуктов афереза от опухолевых клеток, призванные улучшить результаты после проведения АутоТГСК [32, 36]. В нашем Центре для обеспечения АутоТГСК после высокодозной ХТ использовали только неочищенные ПСКК. В 2013 году опубликованы результаты 3-й фазы рандомизированного исследования (COG A3973) по применению очищенных и неочищенных ГСК у пациентов с нейробластомой высокого риска [32]. По результатам этого исследования сделано два интересных наблюдения.

1. Иммуномагнитная очистка ПСКК не улучшает ни бессобытийную, ни общую выживаемость пациентов с нейробластомой. Это может быть связано с невозможностью 100%-й очистки клеток или наличием МОБ у пациентов.

2. Наличие определяемой экспрессии пяти генов (*CHGA*, *DCX*, *DDC*, *PHOX2B* и *THmRNA*), выявляемой в продукте афереза методом TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*), имеет достоверно плохое прогностическое значение. Общая 5-летняя выживаемость этих

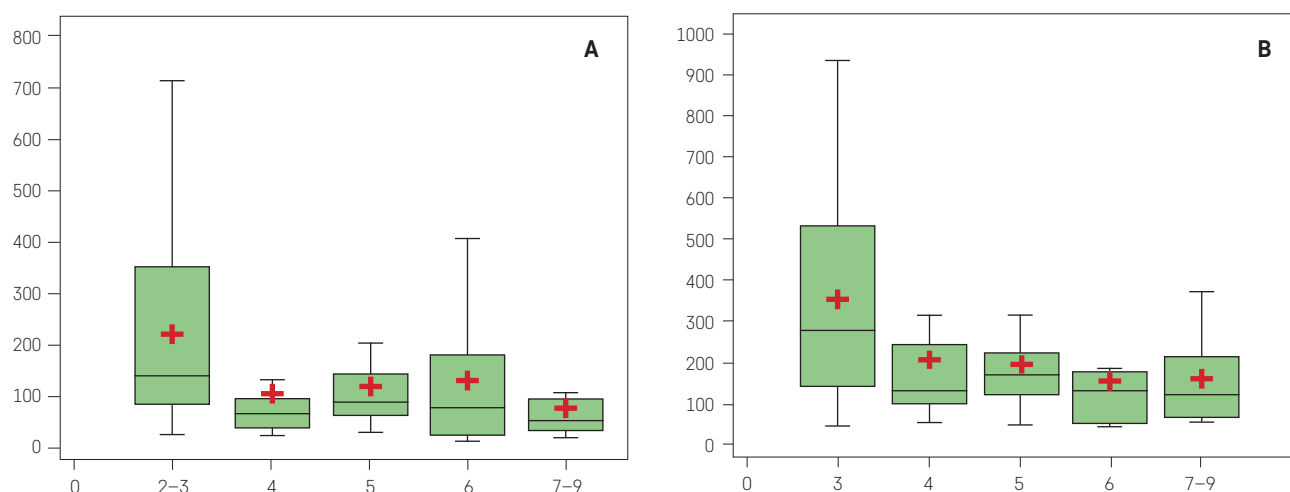
Таблица 4

Корреляционный тест. *Coefficients of determination (R2) / p-values*

Показатель	Кол-во блоков	CD34+ 1-й контроль n=116	CD34+ 2-й контроль n=37	CD34+ 3-й контроль n=11	CD34+ накануне афереза	CD34+ в день афереза	Прирост CD34+	Длительность афереза, мин	CE2	CD34+ $\times 10^6$	CD34+ $\times 10^6/\text{кг}$
Количество блоков	1/0	0,257	0,186	0,664	0,306	< 0,001	< 0,002	0,063	0,085	< 0,001	< 0,0001
CD34+ 1-й контроль, n=116	0,011	1/0	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,073	0,003	< 0,0001
CD34+ 2-й контроль, n=37	0,049	0,813	1/0	0,190	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,027	0,234	0,101	< 0,004
CD34+ 3-й контроль, n=11	0,022	0,935	0,267	1/0	< 0,0001	0,149	0,152	0,157	0,475	0,947	0,211
CD34+ накануне афереза	0,009	0,912	0,985	0,997	1/0	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,028	< 0,0001	< 0,0001
CD34+ в день афереза	0,085	0,515	0,701	0,217	0,602	1/0	< 0,0001	< 0,0001	0,134	< 0,0001	< 0,0001
Прирост CD34+	0,085	0,467	0,700	0,213	0,556	0,944	1/0	< 0,0001	0,146	< 0,0001	< 0,0001
Длительность афереза, мин	0,03	0,212	0,132	0,209	0,214	0,260	0,245	1/0	0,477	0,162	< 0,0001
CE2	0,026	0,028	0,040	0,058	0,042	0,020	0,018	0,004	1/0	< 0,019	< 0,040
CD34+ $\times 10^6$	0,097	0,074	0,075	0,001	0,112	0,381	0,366	0,017	0,047	1/0	< 0,0001
CD34+ $\times 10^6/\text{кг}$	0,151	0,297	0,215	0,167	0,338	0,762	0,725	0,119	0,036	0,579	1/0

Рисунок 3

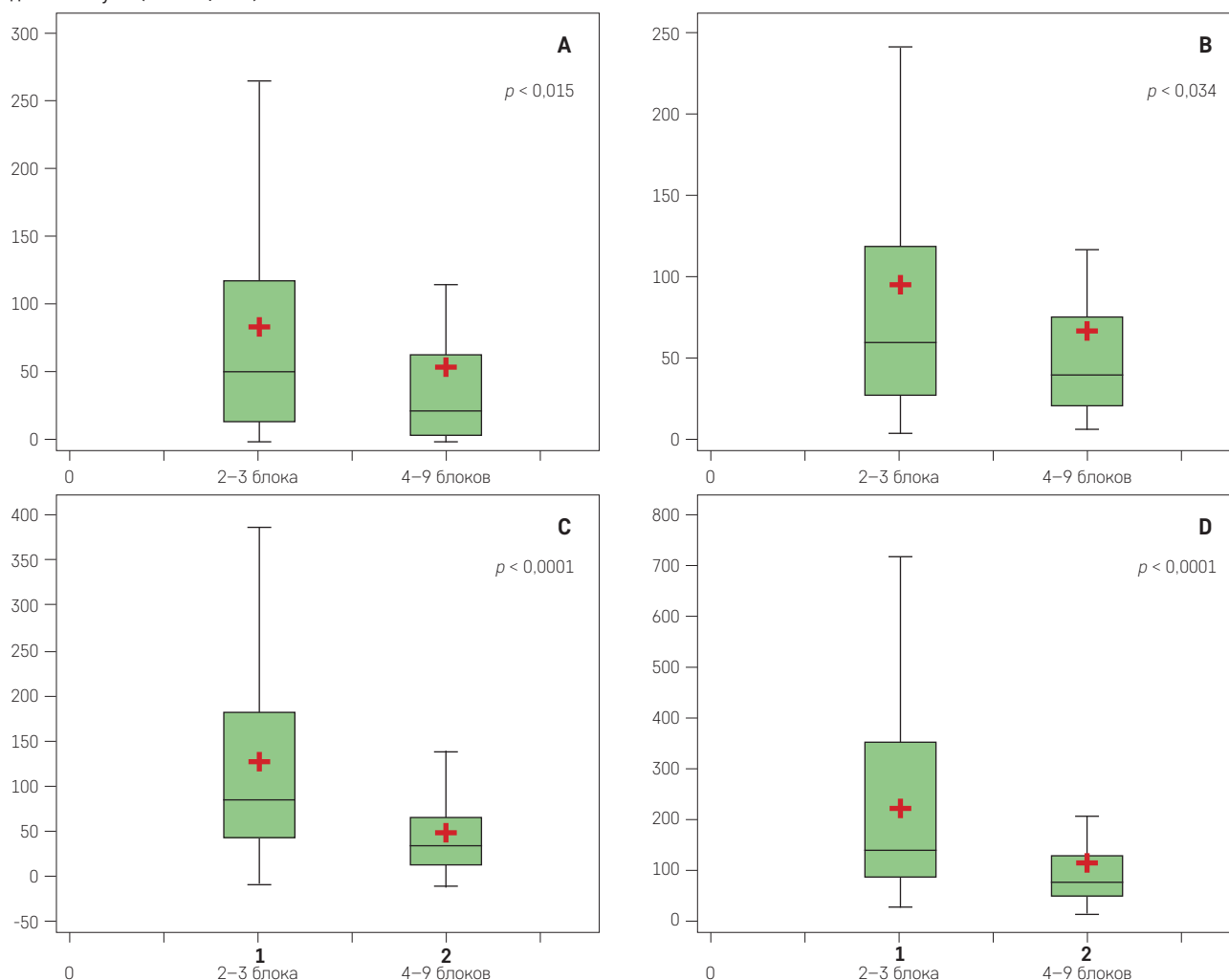
Влияние количества индукционных блоков химиотерапии до начала мобилизации на результат мобилизации и афереза



Примечание: **A** – число CD34+ клеток в периферической крови в день афереза (клеток/мкл); **B** – абсолютное количество CD34+ клеток в продукте афереза (клеток/мкл). От 2-х до 3-х блоков ХТ – n=55; 4 блока – n=15; 5 блоков – n=33; 6 блоков – n=7; от 7 до 9 блоков – n=6.

Рисунок 4

Влияние количества индукционных блоков химиотерапии до начала мобилизации на результат мобилизации (на число CD34+ клеток в ПК в день 1-го контроля, накануне афереза, в день афереза и прирост количества CD34+ ко дню афереза относительно дня накануне (клеток/мкл))



Примечание: **A** – число CD34+ в день 1-го контроля; **B** – число CD34+ накануне афереза; **C** – прирост количества CD34+ ко дню афереза относительно предыдущего контроля; **D** – число CD34+ в день афереза; **1** – до 3-х индукционных блоков ХТ к моменту мобилизации (n=55); **2** – более 3-х блоков индукционной ХТ к моменту мобилизации (n=61).

пациентов составила 41%, бессобытийная – всего 29% против соответственно 62 и 51% среди пациентов с невыявленной экспрессией этих генов.

В 2015 году в нашем Центре начато исследование наличия экспрессии генов *DCX*, *PHOX2B* и *Th* методом полимеразной цепной реакции в продукте афереза. Интерпретация результатов исследования МОБ не входит в задачи данной публикации.

Заключение

Мониторинг количества CD34+ клеток на разных этапах их мобилизации помогает модифицировать ее стратегию, направленную на достижение в допустимые сроки как можно большего числа CD34+ клеток ко дню афереза. Дополнительно это дает возможность исключить инвазивные вмешательства и выполнение неэффективных аферезов у тех пациентов, которые не достигли минимального необходимого числа циркулирующих CD34+ клеток в периферической крови. Мобилизация и аферез ГСК должны состояться после второго или третьего

блока ХТ, если достигнута санация костного мозга. Третий блок индукционной ХТ – это точка, после которой прослеживается снижение эффективности мобилизации и результатов аферезов. Даже у пациентов, имеющих 15 CD34+ клеток в периферической крови в день афереза, применение тактики увеличения продолжительности и объема аферезов до LVL и XLVL помогает достичь целевых значений ГСК в продукте за один аферез [18]. По результатам настоящего исследования и данным литературы, аферезы у маленьких детей хорошо переносятся – а это подавляющее большинство пациентов с нейробластомой [37–39].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Е.Е. Курникова <http://orcid.org/0000-0003-4767-5382>

Литература

- Caron H.N., Pearson A.D.J. Neuroblastoma. In: Voute P.A., Barrett A., Stevens M.C.G., Caron H.N., eds. *Cancer in Children*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2005:337–352.
- Brodeur G.M., Maris J.M. Neuroblastoma. In: Pizzo, D.A., Poplack, D.G., eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA, Lippincott: Williams & Wilkins; 2006:933–970.
- Luksch R., Castellani M. R., Collini P., De Bernardi B., Conte M., Gambini C. et al. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;107:163–181.
- Seeger R.C., Brodeur G.M., Sather H., Dalton A., Siegel S.E., Wong K.Y. et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313(18):1111–1116.
- Shimada H., Stram D.O., Chatten J., Joshi V.V., Hachitanda Y., Brodeur G.M. et al. Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(19):1470–1476.
- Brodeur G.M., Maris J.M., Yamashiro D.J., Hogarty M.D., White P.S. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19(2):93–101.
- NB2004 protocol. Berthold F. (principal investigator) [cited 2016 March 15]. Available at: http://www.kinderkrebsinfo.de/dlja_specialistov/protokoly_gpoh/pohkinderkrebsinfoterapiestudien/nb2004/index_rus.html.
- Pearson A.D., Pinkerton C.R., Lewis I.J., Imeson J., Ellershaw C., Machin D.; European Neuroblastoma Study Group; Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG formerly United Kingdom Children's Cancer Study Group). High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2008;9(3):247–256.
- Park J.R., Eggert A., Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):65–86.
- Matthay K.K., Reynolds C.P., Seeger R.C., Shimada H., Adkins E.S., Haas-Kogan D. E et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1007–1013.
- Grupp S.A., Cohn S.L., Wall D., Reynolds P.C.; Hematopoietic Stem Cell Transplant Discipline and the Neuroblastoma Disease Committee, Children's Oncology Group. Collection, storage, and infusion of stem cells in children with high-risk neuroblastoma: saving for a rainy day. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46(7):719–722.
- Cheung N.K., Kushner B.H., La Quaglia M., Kramer K., Gollamudi S., Heller G. et al. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):227–230.
- Donzella G.A., Schols D., Lin S.W., Esté J.A., Nagashima K.A., Maddon P.J. et al. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 1998;4(1):72–77.
- Liles W.C., Broxmeyer H.E., Rodger E., Wood B., Hübel K., Cooper S. et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003;102(8):2728–2730.
- Flatt T., Lewing K., Gonzalez C., Anthony K., Ryan R., Jones R. et al. Successful mobilization with AMD3100 and filgrastim with engraftment of autologous peripheral blood stem cells in a heavily

- pretreated pediatric patient with recurrent Burkitt lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010;27(2):138–149.
16. Toledano H., Yahel A., Cohen I.J., Yaniv I., Stein J. Successful mobilization, harvest and transplant of peripheral blood stem cells using AMD3100 and G-CSF following high dose craniospinal irradiation for medulloblastoma in a young child. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(4):613–615.
 17. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M., Nayar R., Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hemotherapy and Graft Engineering. *J Hematother*. 1996;5(3):213–226.
 18. Dubrovsky L., Wong E.C., Perez-Albuena E., Loechelet B., Kamani N., Sande J. et al. CD34+ Collection efficiency as a function of blood volumes processed in Pediatric autologous peripheral blood stem cell collection. *J Clin Apher*. 2011;26(3):131–137.
 19. Reinhardt P., Brauning S., Bialleck H., Thoraus K., Smith R., Schrezenmeier H. et al. Automatic interface-controlled apheresis collection of stem/progenitor cells: results from an autologous donor validation trial of a novel stem cell apheresis device. *Transfusion*. 2010;51(6):1321–1330.
 20. Lie A.K., To L.B. Peripheral Blood Stem Cells: Transplantation and Beyond. *Oncologist*. 1997;2(1):40–49.
 21. Modak S., Cheung I.Y., Kushner B.H., Kramer K., Reich L., Cheung N.K. Plerixafor plus granulocyte-colony stimulating factor for autologous hematopoietic stem cell mobilization in patients with metastatic neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(3):469–471.
 22. Maschan A.A., Balashov D.N., Kurnikova E.E., Trakhtman P.E., Boyakova E.V., et al. Efficacy of plerixafor in children with malignant tumors failing to mobilize a sufficient number of hematopoietic progenitors with G-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(8):1089–1091.
 23. Sevilla J., Gonzalez-Vicent M., Madero L., Garcia-Sanchez F., Diaz M.A. Granulocyte colony stimulating factor alone at 12 microg/kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(7):417–420.
 24. Bensinger W., Appelbaum F., Rowley S., Storb R., Sanders J., Lilleby K. et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol*. 1995;13(10):2547–2555.
 25. Giral S., Costa L., Schriber J., Dipersio J., Maziarz R., McCarty 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.
 26. Kroger N., Renges H., Kruger W., Gutensohn K., Löliger C., Carrero I. et al. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte colony stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 2000;111(3):761–765.
 27. Meier R., Mühlethaler-Mottet A., Flahaut M., Coulon A., Fusco C., Louache F. et al. The chemokine receptor CXCR4 strongly promotes neuroblastoma primary tumour, metastatic growth, but not invasion. *PLoS One*. 2007;2(10):e1016.
 28. Geminder H., Sagi-Assif O., Goldberg L., Meshel T., Rechavi G., Witz I.P. et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXCL chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol*. 2001;167(8):4747–4757.
 29. Airolidi I., Raffaghello L., Piovani E., Cocco C., Carlini B., Amadori A. CXCL12 does not attract CXCR4^{hi} human metastatic neuroblastoma cells: clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2006;12(1):77–82.
 30. Carlisle A.J., Lyttle C.A., Carlisle R.Y., Maris J.M. CXCR4 expression heterogeneity in neuroblastoma cells due to ligand-independent regulation. *Mol Cancer*. 2009;8:126.
 31. Bensimhon P., Villablanca J.G., Sender L.S., Matthay K.K., Park J.R., Seeger R. et al. Peripheral blood stem cell support for multiple cycles of dose intensive induction therapy is feasible with little risk of tumor contamination in advanced stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(4):596–602.
 32. Kreissman S.G., Seeger R.C., Matthay K.K., London W.B., Spoto R., Grupp S.A. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):999–1008.
 33. Chambon F., Tchirkov A., Pereira B., Rochette E., Demeocq F., Kanold J. Molecular assessment of minimal residual disease in PBSC harvests provides prognostic information in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; published online March 21.
 34. Burchill S.A., Kinsey S.E., Picton S., Roberts P., Pinkerton C.R., Selby P. et al. Minimal residual disease at the time of peripheral blood stem cell harvest in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36(1):213–219.
 35. Corrias M.V., Haupt R., Carlini B., Parodi S., Rivabella L., Garaventa A. et al. Peripheral blood stem cell tumor cell contamination and survival of neuroblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5680–5685.
 36. Reynolds C.P., Seeger R.C., Vo D.D., Black A.T., Wells J., Ugelstad J. Model system for removing neuroblastoma cells from bone marrow using monoclonal antibodies and magnetic immunobeads. *Cancer Res*. 1986;46(11):5882–5886.
 37. Cherqaoui B., Rouel N., Defachelles A.S., Auvrignon A., Demeocq F., Merlin E. Peripheral blood stem cell collection in low-weight children: retrospective comparison of two apheresis devices. *Transfusion*. 2014;54(5):1371–1378.
 38. Ravagnani F., Coluccia P., Notti P., Arienti F., Bompadre A., Avella M. et al. Peripheral blood stem cell collection in pediatric patients: feasibility of leukapheresis under anesthesia in uncompliant small children with solid tumors. *J Clin Apher*. 2006;21(2):85–91.
 39. Delgado J., Fernandez-Jimenez M.C., Martinez A., Sastre A., Garcia-Miguel P., Hernandez-Navarro F., et al. Analysis of factors affecting PBPC collection in low-weight children with malignant disorders. *Cytotherapy*. 2004;6(1):43–49.