

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

**Wojciech Czogała**

**Ocena wpływu różnych dawek  
czynnika wzrostu kolonii granulocytów  
na skuteczność mobilizacji komórek krwiotwórczych  
w obserwacji klinicznej i modelu eksperymentalnym**

Praca doktorska

**PROMOTOR: PROF. DR HAB. MARCIN MAJKA**

Pracę wykonano w Zakładzie Transplantologii Katedry Immunologii  
Klinicznej i Transplantologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik Katedry: Dr hab. Maciej Siedlar, prof. UJ

Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. Marcin Majka

Kraków, 2013

*Panu Profesorowi Marcinowi Majce wyrażam wdzięczność  
za cierpliwą pomoc, poświęcony czas i wszechstronne wsparcie  
w trakcie realizacji badań i pisania niniejszej pracy.*

*Dziękuję też Wszystkim,  
którzy swoją wiedzą i życzliwością przyczynili się do jej powstania, zaś w sposób  
szczególny*

*Pani dr hab. Jolancie Goździk oraz Koleżankom i Kolegom  
z Oddziału Przeszczepiania Komórek Krwiotwórczych USD w Krakowie,*

*Oktawiuszowi Wiesze, Tomaszowi Adamusowi  
i wszystkim Kolegom z Zakładu Transplantologii,*

*Zespołowi Zwierzętarni  
oraz mojej Żonie Małgorzacie za cenne uwagi, cierpliwość i pomoc merytoryczną*

*Pracę dedykuję moim Rodzicom w wdzięcznością za bycie przewodnikami i nauczycielami*

## SPIS SKRÓTÓW:

ALL - ostra białaczka limfoblastyczna

allo-HSCT – (ang. *allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*) - przeszczepienie allogenicznych komórek krwiotwórczych

AML - ostra białaczka szpikowa

ang. – w języku angielskim

auto-HSCT – (ang. *autologous haematopoietic stem cell transplantation*) - przeszczepienie autologicznych komórek krwiotwórczych

Balb/c - nazwa jednego ze szczepów wsobnych myszy wykorzystanych w pracy

BFU – E - (ang. *burst forming unit – erythroid*) jednostki tworzące skupiska erytrocytów

C57BL/6 – nazwa jednego ze szczepów wsobnych myszy wykorzystanych w pracy

CBA - nazwa jednego ze szczepów wsobnych myszy wykorzystanych w pracy

CD – (ang. *cluster of differentiation*) – symbolem tym wraz z następującą po nim liczbą oznacza się antygeny występujące na powierzchni leukocytów

CD62L – ligand CD62

CFU – G (ang. *colony forming unit – granulocyte*) jednostki tworzące kolonie granulocytarne

CHT – chemioterapia

c-kit - mysi antygen występujący na powierzchni wczesnych komórek hematopoetycznych

CR - remisja całkowita

CXCL – (ang. *CXC chemokine receptor ligand*) – ligand receptora chemokin CXC

CXCR – (ang. *CXC chemokine receptor*) – receptor chemokin CXC

DBA - nazwa jednego ze szczepów wsobnych myszy wykorzystanych w pracy

dgn – rodzaj choroby podstawowej, diagnoza

FBS - (ang. *fetal bovine serum*) – surowica izolowana z płodów cielęcych

FITC – (ang. *fluorescein isothiocyanate*) – znacznik fluorescencyjny stosowany do znakowania przeciwciał w cytometrii przepływownej

G-CSF – (ang. *granulocyte colony stimulating factor*) - czynnik wzrostu kolonii granulocytarnych

GRO- $\beta$  – (ang. *growth-regulated protein beta*) – regulowana wzrostem proteina beta (inaczej CXCL2)

HD - choroba Hodgkina

HSCs - macierzyste komórki krwiotwórcze

IL - interleukina

LDH – (ang. *lactic dehydrogenase*) dehydrogenaza mleczanowa

MethoCult GF 3434 - medium hodowlane firmy Stem Cells Technologies

MMPs – (ang. *matrix metalloproteinases*) metaloproteiny macierzy

mRNA – z ang. *messenger RNA* – matrycowy RNA

NHL - chłoniaki nieziarnicze

PBPC – z ang. *peripheral blood progenitor cells* - komórki progenitorowe z krwi obwodowej

PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej

PBSC – ( *peripheral blood stem cells*)- komórki macierzyste z krwi obwodowej

PE – (ang. *phycoerythrin*)- znacznik fluorescencyjny stosowany do znakowania przeciwciał w cytometrii przepływowej

PE-Cy-5 – (ang. *phycoerythrin cyanine*)- znacznik fluorescencyjny stosowany do znakowania przeciwciał w cytometrii przepływowej

RNA – (ang. *ribonucleic acid*)- kwas rybonukleinowy

rhG-CSF – rekombinany humanizowany G-CSF

rt – radioterapia przed mobilizacją.

Sca-1 - myszy antygen występujący na powierzchni wczesnych komórek hematopoetycznych

SCF - (ang. *stem cell factor* ) - czynnik komórek macierzystych

SD – odchylenie standardowe

SDF-1 - (ang. *stromal derived factor 1*) - stromalny czynnik wzrostu

VCAM – (ang. *vascular endothelial cell growth factor*) - czynnik wzrostu komórek śródbłonna naczyniowego

VLA – (ang. *very late antigen*) – antygen bardzo późny

# SPIS TREŚCI

Spis skrótów.....	3
1. WSTĘP.....	8
1.1 Przeszczepienie autologicznych komórek krwiotwórczych.....	8
1.1.1. Wskazania do auto-HSCT .....	8
1.2. Krwiotwórcze komórki macierzyste i mikrośrodowisko szpiku kostnego .....	10
1.3. Krew obwodowa jako źródło komórek hematopoetycznych .....	11
1.4. G-CSF .....	13
1.5. Mobilizacja komórek krwiotwórczych.....	13
1.6. Protokoły mobilizacji .....	14
1.7. Działania niepożądane G-CSF .....	17
1.8. Nowe sposoby mobilizacji.....	17
1.9. Preparaty G-CSF .....	18
1.10. Czynniki wpływające na mobilizację.....	18
1.11. Poor mobilizers.....	19
2. CELE PRACY.....	20
3. Materiał i metody .....	21
3.1. Zwierzęta doświadczalne .....	21
3.1.2. Ocena ilościowa morfotycznych składników krwi metodą automatyczną .....	21
3.1.3. Przygotowanie materiału do badań.....	21
3.1.4. Analiza cytofluorymetryczna hematopoetycznych komórek macierzystych.....	22
3.1.5. Zakładanie klonogenności .....	22
3.1.6. Zamrażanie komórek.....	23
3.1.7. Przeszczepianie macierzystych komórek krwiotwórczych.....	23
3.1.8. Analiza statystyczna.....	24
3.2. Pacjenci i metody .....	25
3.2.1 Analiza statystyczna.....	28
4. Wyniki - Część eksperymentalna.....	29
4.1. Balb/c.....	29

4.1.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF .....	29
4.1.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G-CSF.....	31
4.1.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach in vitro (CFU Assay) .....	33
4.2. DBA.....	35
4.2.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF .....	35
4.2.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G – CSF.....	37
4.2.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach in vitro (CFU Assay) .....	39
4.3. C57BL/6.....	40
4.3.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF .....	40
4.3.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G – CSF.....	42
4.3.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach in vitro (CFU Assay) .....	44
4.4. CBA.....	45
4.4.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF .....	45
4.4.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G – CSF.....	47
4.4.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach in vitro (CFU Assay) .....	49
4.5. Odnowienie hematopoezy przy użyciu krwi obwodowej mobilizowanej różnymi dawkami G-CSF w mysim modelu syngenicznym .....	51
4.5.1. Szczep Balb/c .....	51
4.5.2. Szczep CBA .....	55
5. Wyniki – obserwacja kliniczna .....	57
5.1. Ocena skuteczności mobilizacji.....	57
5.1.2. I cykl mobilizacji.....	57
5.1.2. II cykl mobilizacji .....	62

5.2 Ocena czynników wpływających na skuteczność mobilizacji – analiza jednoczynnikowa .....	62
5.2.1. Wpływ dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji .....	62
5.2.2. Wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji na skuteczność mobilizacji.....	64
5.2.3. Wpływ płci na skuteczność mobilizacji .....	66
5.2.4. Wpływ rodzaju choroby podstawowej na skuteczność mobilizacji.....	68
5.2.5. Wpływ rodzaju mobilizacji na jej skuteczność .....	69
5.3. Analiza wieloczynnikowa .....	71
6. Dyskusja .....	80
6.1. Część eksperymentalna .....	80
6.1.1. Wpływ dawki G-CSF na liczbę leukocytów w mobilizowanej krwi obwodowej.....	80
6.1.2. Wpływ dawki G-CSF na liczbę komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej oraz zdolności komórek krwiotwórczych do proliferacji in vitro .....	81
6.1.3. Wpływ dawki G-CSF na zdolność komórek krwiotwórczych do proliferacji i odnowy hematopoezy in vivo .....	84
6.1.4. Podsumowanie części doświadczalnej .....	87
6.2. Skuteczność różnych dawek G-CSF w obserwacji klinicznej.....	88
6.3 Podsumowanie.....	93
7. Wnioski.....	94
8. Streszczenie .....	95
9. Summary .....	97
10. Literatura .....	99
11. Spis tabel .....	110
12. Spis rysunków i wykresów .....	112

# 1. WSTĘP

## 1.1. PRZESZCZEPIENIE AUTOLOGICZNYCH KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

Wysokodawkowana chemioterapia i przeszczepienie autologicznych komórek krwiotwórczych (auto-HSCT) jest obecnie powszechnie stosowaną procedurą leczniczą u pacjentów z różnymi chorobami nowotworowymi, a także nieproliferacyjnymi, m. in. chorobami autoimmunizacyjnymi. Pomimo znacznego postępu wiedzy, nadal jednym z podstawowych ograniczeń zastosowania tego sposobu leczenia są trudności w pozyskaniu odpowiedniej liczby komórek krwiotwórczych do zapewnienia sprawnej rekonstrukcji hematopoezy. Początkowo w tym sposobie terapii wykorzystywano komórki pobrane ze szpiku kostnego, jednak z powodu powikłań standardowego leczenia, tylko u nielicznych pacjentów udawało się w ten sposób zabezpieczyć odpowiednią liczbę komórek krwiotwórczych. Obecnie w większości auto-HSCT wykorzystuje się komórki krwiotwórcze z krwi obwodowej (PBSC) mobilizowane poprzez stymulację czynnikiem wzrostu kolonii granulocytarnych (G-CSF). Pomimo, że zjawisko mobilizacji jest stosunkowo dobrze poznane, nadal u pewnej grupy pacjentów nie udaje się uzyskać wystarczającej liczby PBSC do przeszczepienia. Nie został również ustalony jeden schemat mobilizacji ani optymalna dawka G-CSF.

### 1.1.1 Wskazania do auto-HSCT

Podstawowym wskazaniem do wysokodawkowanej chemioterapii i auto-HSCT są choroby nowotworowe. Wskazania u dorosłych pacjentów stanowią głównie szpiczak mnogi, chłoniaki złośliwe czy białaczki [39,57,74]. U dzieci nieco powyżej połowy przeszczepień autologicznych dotyczy pacjentów z guzami litymi, takimi jak: zwojak współczulny zarodkowy, guz Wilmsa, mięsak Ewinga, guzy zarodkowe, czy guzy mózgu [80,108]. W przypadku zwojaka współczulnego zarodkowego wskazaniem do auto-HSCT jest IV stadium zaawansowania u dzieci powyżej pierwszego roku życia oraz delecja 1p i/lub ekspresja onkogenu n-myc, nawet u pacjentów z niższym stopniem



zaawansowania tego nowotworu [108]. Do auto-HSCT kwalifikowani są również pacjenci z mięśniakiem Ewinga w IV stopniu zaawansowania lub po lokalnej wznowie, nerczakiem zarodkowym o niekorzystnej histopatologii oraz w razie wznowy, guzami zarodkowymi po wznowie i w razie progresji choroby, a także mięśniakiem prążkowanokomórkowym w IV stopniu zaawansowania oraz w razie wznowy w lokalizacji uniemożliwiającej leczenie operacyjne. Wśród guzów mózgu wskazaniem do auto-HSCT są rdzeniaki zarodkowy i glejak o wysokim stopniu złośliwości wrażliwe na chemioterapię [108]. Drugą grupę wskazań do auto-HSCT stanowią choroby limfomieloproliferacyjne: chłoniaki nieziarnicze (NHL), choroba Hodgkina (HD), ostra białaczka szpikowa (AML), rzadziej ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) [80,107]. W przypadku NHL auto-HSCT wykonywane jest już w pierwszej remisji całkowitej (CR) u pacjentów, u których obserwowano trudności w uzyskaniu remisji lub uzyskano jedynie częściową remisję. U dzieci w II lub III remisji NHL preferowane jest allo-HSCT, a przeszczepienie autologiczne wykonywane jest jedynie w razie braku odpowiedniego dawcy allogenicznych komórek krwiotwórczych. Wskazaniem do wysokodawkowanej chemioterapii i auto-HSCT u pacjentów z HD jest progresja choroby w czasie wstępnego leczenia oraz wznowa w ciągu 12 miesięcy od uzyskania I CR. Do auto-HSCT kwalifikowani są pacjenci z AML tylko w wybranych wskazaniach, w przypadku braku odpowiedniego dawcy. W leczeniu ALL auto-HSCT wykonywane jest wyjątkowo, u pacjentów ze wznową choroby, dla których nie udaje się znaleźć dawcy allogenicznych komórek krwiotwórczych [107].

Wysokodawkowana chemioterapia wspomagana przez auto-HSCT jest wykorzystywana również w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych opornych na konwencjonalną terapię, takich jak: młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, toczeń układowy, twardzina uogólniona z zajęciem płuc, a także cytopenie uwarunkowane immunologicznie (autoimmunizacyjna anemia hemolityczna, małopłytkowość immunologiczna) [63,84].

## 1.2 KRWIOTWÓRCZE KOMÓRKI MACIERZYSTE I MIKROŚRODOWISKO SZPIKU KOSTNEGO

Komórki macierzyste charakteryzują dwie cechy, odróżniające je od wszystkich innych typów komórek: są nieśmiertelne (zdolne do samoodnowy) oraz mogą różnicować się we wszystkie typy komórek organizmu [12, 109]. Ze względu na te właściwości istnieje pewna hierarchia, zależna od stopnia zróżnicowania komórek [94]. Wyróżnia się komórki totipotentne, które mogą różnicować się w każdy typ komórek, w tym w komórki tworzące łożysko. Komórki pluripotentne mogą dać początek każdemu typowi komórek, za wyjątkiem komórek łożyska. Natomiast komórki multipotentne mogą różnicować się tylko w kilka typów komórek. Powstające z nich komórki unipotentne posiadają zdolność do tworzenia tylko jednego typu komórek. Istnieje stan homeostazy, w którym komórki macierzyste podlegają asymetrycznym podziałom prowadzącym do wytworzenia komórki zróżnicowanej i odtworzenia komórki macierzystej. Procesy te podlegają ścisłej regulacji przez czynniki wewnątrzkomórkowe, zależnie od potrzeb organizmu [45]. Macierzyste komórki krwiotwórcze HSCs (ang. *hematopoietic stem cells*) dają początek wszystkim typom komórek krwi w procesie hematopoezy, zarówno linii mieloidalnej, jak i limfoidalnej. Ze względu na stopień proliferacji określane są jako komórki multipotentne (mogące różnicować się w kilka typów komórek) [3].

U dorosłych ssaków zdecydowana większość macierzystych komórek krwiotwórczych znajduje się w szpiku kostnym, tylko niewielka ich część krąży w krwi obwodowej [2,113]. Dodatkowo komórki wykazują możliwość migracji pomiędzy tymi dwoma środowiskami, co uwarunkowane jest stanem fizjologicznym organizmu i działaniem hematopoetycznych czynników wzrostu [103]. Proces migracji komórek ze szpiku do krwi określa się mianem mobilizacji (ang. *mobilization*), natomiast przemieszczania w kierunku odwrotnym – zagnieżdżaniem (ang. *homing*). Pomimo, że pula komórek krwiotwórczych mobilizowanych do krwi zawiera różne populacje rzeczywistych komórek macierzystych oraz zróżnicowanych („zaangażowanych” w rozwój konkretnych linii komórek krwi, ang. *committed*) komórek progenitorowych, to często są one zbiorczo nazywane komórkami macierzystymi (ang. *stem cells*) [76].

Mikrośrodowisko szpiku kostnego złożone z komórek podścieliska, śródbłonna, osteoblastów i innych składników substancji międzykomórkowej (m.in.: kolagenu, fibronektyn, proteoglikanu) powoduje zakotwiczenie hematopoetycznych komórek macierzystych poprzez szeroki zakres interakcji adhezyjnych. Komórki macierzyste posiadają na swojej powierzchni wiele różnych receptorów: molekuly adhezyjne związane z funkcją limfocytów Ag-1, bardzo późny Ag-4 i Mac-1, receptory chemokin CXCR4 i CXCR2, powierzchniowe glikoproteiny CD44, CD62L i receptor kinazy tyrozynowej c-kit. Macierz szpiku kostnego zawiera natomiast SDF-1 (ang. *stromal derived factor*), CXC chemokinę GRO- $\beta$ , VCAM-1, kit ligand, selektynę P, ligand glikoprotein-1, kwas hialuronowy. Wszystkie te składniki macierzy są ligandami dla molekuł adhezyjnych komórek macierzystych [14,68,112]. Dane płynące z badań doświadczalnych wykazały, że hamowanie tych interakcji receptor-ligand skutkuje wzmocnieniem mobilizacji komórek progenitorowych [22,66,71].

### **1.3. KREW OBWODOWA JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH**

Przez wiele lat materiałem używanym do przeszczepienia był szpik kostny. W latach dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku nastąpiła zmiana w pozyskiwaniu autologicznych komórek progenitorowych. Obecnie zdecydowana większość przeszczepień autologicznych i ok. 70% allogenicznych komórek krwiotwórczych wykonywanych jest z wykorzystaniem materiału uzyskanego z krwi obwodowej [73,85]. Mobilizowane komórki krwiotwórcze są preferowanym źródłem komórek macierzystych i progenitorowych do przeszczepień autologicznych ze względu na większą liczbę tych komórek, co pozwala na szybsze wszczepienie oraz zmniejszone ryzyko procedury, w porównaniu do komórek otrzymanych ze szpiku kostnego [20]. W wielu badaniach wykazano kliniczne różnice między komórkami pochodzącymi ze szpiku kostnego i z krwi obwodowej. Najważniejsza dotyczyła kinetyki wszczepiania komórek krwiotwórczych i zdolności odtwarzania układu białokrwinkowego i płytkotwórczego [9,21,93]. W latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku opublikowano pierwsze dane dokumentujące obecność komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej w stanie homeostazy, początkowo u zwierząt, a następnie u ludzi [54]. Zdolność

obwodowych komórek progenitorowych (PBPC – peripheral blood progenitor cells) do rekonstrukcji hematopoezy została po raz pierwszy opisana w 1980 roku [1]. W stanie równowagi komórki progenitorowe krążą w krwi obwodowej w ilości około 100 komórek na 1 ml pełnej krwi. W celu uzyskania wystarczającej do użytku klinicznego ilości komórek progenitorowych opracowano metody ich mobilizacji ze szpiku do krwi obwodowej. Abrams i Richman wykazali na modelu zwierzęcym wzrost ilości PBPC po zastosowaniu subablacyjnej chemioterapii [1, 86]. To i wsp. stwierdzili natomiast wysoki poziom komórek progenitorowych u pacjentów z białaczką we wczesnej remisji [103]. Podwyższoną ilość komórek progenitorowych we krwi obwodowej wykazano również u chorych z zespołami mieloproliferacyjnymi [43]. Socinski i Gianni obserwowali wzrost ilości komórek progenitorowych u pacjentów po podaniu cytokin [37,97]. Początkowo protokoły mobilizacji opierały się wyłącznie na chemioterapii. Jednakże, po odkryciu ludzkiego G-CSF (czynnika wzrostu kolonii granulocytarnych) przez Welta i wsp. [111], włączono ten czynnik do protokołów mobilizacji i obecnie jest on stosowany standardowo [103].

Stromalny czynnik wzrostu SDF-1 (ang. *stromal derived factor 1*), nazywany również CXCL12 (ang. *CXC chemokine receptor ligand*), jest chemokiną produkowaną przez niehematopoetyczne komórki szpiku kostnego [77], w szczególności osteoblasty [95]. Ekspresję receptora CXCR4 (ang. *CXC chemokine receptor*) dla stromalnego czynnika wzrostu, wykazują macierzyste komórki krwiotwórcze, jak również dojrzałe limfocyty [112]. Wspólne oddziaływanie stromalnego czynnika wzrostu i jego receptora umożliwia utrzymywanie komórek w mikrośrodku szpiku kostnego.

Regulacja tej interakcji możliwa jest na dwa sposoby. Poprzez spadek ekspresji cytokiny SDF-1 na poziomie mRNA, co tłumaczy się wyciszającym działaniem G-CSF na osteoblasty [95]. Drugą możliwością jest zablokowanie receptora CXCR4, poprzez jego proteolityczną inaktywację, w wyniku działania czynnika G-CSF [58].

## 1.4. G-CSF

Czynnik wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF – *granulocyte colony stimulating factor*) jest glikoproteiną, wytwarzaną w licznych tkankach, przede wszystkim jednak przez komórki linii monocytarno - makrofagowej w celu stymulacji szpiku kostnego do produkcji i uwalniania do krwi obwodowej granulocytów. G-CSF stymuluje także, proliferację, różnicowanie i dojrzewanie prekursorów oraz przeżycie dojrzałych granulocytów poprzez łączenie się z receptorem dla G-CSF (G-CSFR), obecnym na powierzchni tych komórek [7,44,64].

Czynnik wzrostu kolonii granulocytów jest stosowane w profilaktyce gorączki neutropenicznej. Profilaktyka pierwotna zalecana jest u pacjentów, u których istnieje wysokie ryzyko wystąpienia gorączki neutropenicznej ze względu na wiek, współistniejące choroby, charakterystykę choroby podstawowej oraz mielotoksyczność zastosowanej chemioterapii. Wskazaniem do profilaktyki wtórnej jest wystąpienie powikłań neutropenii w czasie uprzednich cykli chemoterapii, jeśli redukcja dawek leków przeciwnowotworowych miałaby niekorzystnie wpłynąć na efekt leczenia. Neutropenia bez gorączki nie jest wskazaniem do stosowania czynnika wzrostu kolonii granulocytów [96]. Zastosowanie G-CSF u pacjentów z gorączką neutropeniczną skraca czas hospitalizacji oraz okres ustępowania neutropenii, wpływ na śmiertelność związaną z zakażeniami w trakcie neutropenii nie jest jednoznaczny [19].

## 1.5. MOBILIZACJA KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

Mobilizacja to proces pozyskiwania krwiotwórczych komórek macierzystych lub progenitorowych do krwi obwodowej w następstwie zastosowania chemioterapii lub cytokin. Proces ten przypomina występujące fizjologicznie uwalnianie komórek macierzystych progenitorowych ze szpiku kostnego w odpowiedzi na sygnały stresowe w przebiegu urazu lub stanu zapalnego.

Chemioterapia i powtarzana stymulacja przez cytokiny, takie jak G-CSF, powoduje uwalnianie związanego z błoną czynnika komórek macierzystych (*stem cell*

*factor* – SCF), proliferację komórek progenitorowych oraz aktywację i/lub degradację cząstek adhezyjnych, takich jak VLA-4 i selektyn P/E. Istotną rolę w procesie mobilizacji komórek progenitorowych odgrywa uwalnianie i inaktywacja chemokin: SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*)/CXCL12 i interleukiny 8 (IL-8)/CXCL8 oraz wielokrotnie powtarzające się cykle inaktywacji i degradacji składników szpiku kostnego przez elastazę, katepsynę G, proteinazę 3, CD26 i różne metaloproteinazy (*matrix metalloproteinases* – MMPs)[ 42,115.].

Proces ten jest identyczny jak wyzwalana przez układ odpornościowy reakcja zapalna (migracja dojrzałych leukocytów) w odpowiedzi na czynnik ją wyzwalający [55, 72, 81]. Jak wykazano dotychczas zmobilizowana w ten sposób frakcja komórek CD34<sup>+</sup> różni się jednak od komórek CD34<sup>+</sup> pobranych ze szpiku. Zmobilizowane komórki krwi wykazują mniejszą ekspresję VLA-4, c-kit i CXCR4, a także znacząco większy ich odsetek należy do frakcji spoczynkowej nie dzielącej się [70]. Ponadto komórki te wykazują większą ekspresję genów proapoptotycznych (kaspazy 3, 4 i 8) oraz redukcję inhibitorów apoptozy (antyproteinaza 2). Należy się spodziewać, że opisane powyżej różnice jakościowe tych frakcji komórek CD34<sup>+</sup> powinny mieć wpływ na jakość i skuteczność ich stosowania w leczeniu za pomocą ich przeszczepienia w określonych grupach pacjentów. Jednak dotychczas jednoznacznie wykazano tylko, że przeszczepienie komórek progenitorowych z krwi wiąże się z szybszą rekonstytucją neutrofilów i płytek krwi. Natomiast nie wykazano innych istotnych różnic w wynikach leczenia za pomocą przeszczepienia autologicznych komórek krwiotwórczych ze szpiku czy zmobilizowanych z krwi [41,49,54,98].

## **1.6. PROTOKOŁY MOBILIZACJI**

Jak dotąd nie został określony jednolity schemat mobilizacji z wykorzystaniem G-CSF; dawki, sposób podawania oraz częstotliwość podawania leku są różne w zależności od ośrodka. G-CSF stosuje się sam, rozpoczynając mobilizację przy normalnej leukocytozie (tzw. z ang. „*steady state*”) lub w skojarzeniu z chemioterapią mobilizującą - wówczas zwykle rozpoczyna się podawanie G-CSF w nadirze leukopenii po chemioterapii. Optymalny schemat mobilizacji komórek krwiotwórczych jest

przedmiotem wielu badań. W przypadku mobilizacji za pomocą samego G-CSF stosowane są dawki od 10 µg/kg/dobę do 32 µg/kg/dobę od czwartego dnia przed pierwszą aferezą aż do przeprowadzenia ostatniej afrezy [8,35]. Wykazano pozytywny efekt zwiększenia dawki G-CSF [23,28,35,40,110], a także podziału dawki dobowej na 2 podania co 12 godzin [50] na skuteczność mobilizacji. W badaniu obejmującym kobiety z rakiem piersi Weaver i wsp. wykazali, że u pacjentek otrzymujących G-CSF w dawce 20, 30 lub 40 µg/kg/dobę w porównaniu do chorych otrzymujących 10 µg/kg/dobę uzyskiwano więcej komórek CD34<sup>+</sup>, potrzebnych było mniej leukaferoz, a ryzyko nieuzyskania  $\geq 5.0 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg masy ciała było 3,3-krotnie niższe [110]. Kröger i wsp. porównali skuteczność mobilizacji z zastosowaniem G-CSF w dawce 10 µg/kg/dobę podawanej raz dziennie z dawką podzieloną (2 x 5 µg/kg/dobę) u pacjentek z rakiem piersi. U chorych, które otrzymywały G-CSF w dawkach podzielonych, w pierwszej aferezie uzyskano więcej komórek CD34<sup>+</sup> (5.8 vs 1.9x10<sup>6</sup>/kg, p=0.003), a średnia liczba przeprowadzonych separacji była mniejsza (1.8 vs 2.3, p=0.01). W badaniu Demirera i wsp. obejmującym 50 dorosłych pacjentów z chłoniakami i szpiczakami porównano skuteczność mobilizacji z zastosowaniem G-CSF w dawkach 8 i 16 µg/kg/dobę podawanym po chemioterapii mobilizującej. Po podaniu G-CSF w dawce 8 µg/kg/dobę uzyskano 2.36 x 10<sup>6</sup>/kg (zakres: 0.21-7.80) komórek CD 34<sup>+</sup>, w porównaniu z 7.99 x 10<sup>6</sup>/kg (2.76-14.89) po podaniu dawki 16 µg/kg/dobę (p<0.001). Zastosowanie wyższej dawki G-CSF wiązało się z krótszym czasem odnowy granulopoezy (odpowiednio: 9 (8-11) i 12 (10-20) dni; p < 0,001), natomiast pozostałe parametry oceniające powikłania okołoprzeszczepowe nie różniły się pomiędzy obiema grupami [23].

Engelhardt i wsp przeprowadzili badanie u zdrowych dawców, stwierdzając, że rhG-CSF w dawce 2x12 µg/kg/dobę w porównaniu z dawką standardową (10 µg/kg/dobę) jest dobrze tolerowany i pozwala na zebranie większej ilości komórek CD34<sup>+</sup> (0,47x10<sup>6</sup>/L aferezy vs 0,25x10<sup>6</sup>/L aferezy; p<0,05). Zastosowanie większej dawki rhG-CSF umożliwiło zebranie  $\geq 4 \times 10^6$ /kg komórek CD34<sup>+</sup> w trakcie 2 standardowych aferez (zakres: 1-3) w porównaniu do 3 aferez (zakres: 1-6) w przypadku dawki standardowej [28]. Halle i wsp. porównali mobilizację obwodowych komórek krwiotwórczych za pomocą czynnika wzrostu granulocytów (G-CSF w dwóch dawkach (10 i 20 µg/kg/dobę) u dzieci z guzami litymi i białaczkami. Stwierdzono

wyższą szczytową wartość komórek CD34<sup>+</sup> w krwi obwodowej w grupie pacjentów otrzymujących wyższą dawkę G-CSF ( $61 \times 10^6/L$  vs  $28 \times 10^6/L$ ;  $p=0,025$ ), wykazano również, że liczba komórek CD34<sup>+</sup> uzyskana w trakcie leukaferazy już po 3. podaniu G-CSF w dawce 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$  nie różni się istotnie od tej uzyskanej z leukaferazy po 4. podaniu G-CSF w niższej dawce (odpowiednio: 1,7 vs  $1,2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg/1 objętość krwi pacjenta). Ostatecznie jednak dla obu dawek G-CSF uzyskano podobną liczbę komórek progenitorowych [40]. Skuteczność i bezpieczeństwo zwiększonej dawki G-CSF (24  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$  w dwóch dawkach podzielonych) w mobilizacji u dzieci potwierdzono w kolejnych badaniach [78,92]. Sevilla i wsp. w grupie 55 dzieci z guzami litymi i nowotworami hematologicznymi uzyskali od 0.4 do  $35 \times 10^6/\text{kg}$  masy ciała (mediana  $4.4 \times 10^6/\text{kg}$  masy ciała) komórek CD34<sup>+</sup>, a u 46 (83.6%) dzieci uzyskano  $2 \times 10^6/\text{kg}$  masy ciała w pojedynczej wysokoobjętościowej leukaferazie. W innym badaniu obejmującym 23 dzieci z guzami litymi i nowotworami układu krwiotwórczego z zastosowaniem tej samej dawki G-CSF (24  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$  w dwóch dawkach podzielonych) u 18 (78%) chorych uzyskano odsetek komórek CD34<sup>+</sup> w krwi obwodowej powyżej  $15 \times 10^6/\text{kg}$  i następnie docelową ilość komórek CD34<sup>+</sup> ( $2 \times 10^6/\text{kg}$  masy ciała) w pojedynczej leukaferazie wysokoobjętościowej. Jeden pacjent wymagał przeprowadzenia 2 separacji, natomiast u 4 dzieci nie udało się zmobilizować komórek krwiotwórczych z zastosowaniem G-CFS (u 2 dzieci mobilizacja powiodła się po podaniu cyklofosfamidu z G-CSF, u 2 ostatecznie konieczne było pobranie komórek macierzystych ze szpiku kostnego) [78]. W obu przedstawionych badaniach dotyczących dzieci wykazano bezpieczeństwo zastosowania zwiększonej do 24  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$  dawki G-CSF, natomiast odmienny wynik uzyskano w badaniu Madero i wsp., w którym stwierdzono zwiększone ryzyko wystąpienia zespołu wszczepiennego u dzieci, które otrzymywały taką dawkę G-CSF, w porównaniu do mniejszych dawek [61].



## **1.7. DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE G-CSF**

Mobilizacja PBSC z zastosowaniem G-CSF jest zwykle dobrze tolerowana, jednakże może powodować zwykle przejściowe i niegroźne powikłania. Najczęściej obserwowane są bóle kostne, ból głowy, nudności [15], obniżenie ilości płytek krwi [102]. Poważne powikłania mogą dotyczyć około 1% pacjentów [4]. U zdrowych dawców mobilizowanych z zastosowaniem G-CSF opisywano nasiloną splenomegalię ze spontanicznym pęknięciem śledziony włącznie [15]. Ze względu na prozakrzepowe działanie G-CSF u osób predysponowanych może dojść do zawału serca bądź niedotlenienia mózgu [15]. Opisywano również związek pomiędzy podawaniem G-CSF a wystąpieniem ostrej białaczki szpikowej [62].

## **1.8. NOWE SPOSOBY MOBILIZACJI**

AMD3100 (plerixafor) jest selektywnym antagonistą receptora CXCR4, który blokuje połączenie z jego ligandem SDF1 $\alpha$ . Interakcja CXCR4/SDF1 jest istotna dla utrzymania komórek macierzystych w szpiku kostnym, stąd AMD3100 uznany został za potencjalny czynnik mobilizacji komórek krwiotwórczych do krwi obwodowej. Przedkliniczne badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że AMD3100 może powodować szybką mobilizację komórek krwiotwórczych posiadających krótko- i długoterminową zdolność repopulacji [15]. Przeprowadzono również wstępne badania kliniczne na zdrowych ochotnikach, pacjentach przygotowywanych do przeszczepienia autologicznych komórek krwiotwórczych oraz zdrowych dawcach komórek krwiotwórczych [15]. U zdrowych ochotników wykazano ponad 10-krotny wzrost PBSC, ze szczytem po 9 godzinach od podskórnego podania AMD3100 [59]. Skuteczną mobilizację za pomocą G-CSF i AMD3100 (podane jednorazowo 6-12 godz. przed aferezą) u chorych ze szpiczakiem i chłoniakami nieziarniczymi przeprowadzili Flomenberg i wsp., natomiast Cashen i wsp. u pacjentów z chorobą Hodgkina [15,31]. Duarte i wsp. wykazali skuteczność plerixaforu w mobilizacji pacjentów ze szpiczakiem i chłoniakami, u których nie udało się pierwsza mobilizacja [26]. Obiecujące wyniki uzyskano również w badaniach obejmujących zdrowych dawców komórek

macierzystych [24]. Stwierdzono, że AMD3100 jest lekiem bezpiecznym, w porównaniu z G-CSF wywołuje mniej działań niepożądanych, charakteryzuje się szybszym działaniem już po jednorazowym podaniu, natomiast mobilizuje mniejszą liczbę komórek CD34+ i może wymagać przeprowadzenia większej ilości aferez [15].

## **1.9. PREPARATY G-CSF**

W Europie dostępne są 2 preparaty G-CSF: filgrastim (Neupogen) i lenograstim (Granocyte). Lenograstim jest produkowany w hodowlach komórek ssaków i jest poddawany glikozylacji, przez co powstaje glikoproteina identyczna z endogenną ludzką cząsteczką. Filgrastim natomiast pochodzi z komórek bakteryjnych. Glikozylacja G-CSF ma istotny wpływ na jego właściwości fizykochemiczne. Taki preparat jest mniej wrażliwy na zmiany pH, temperatury, przez co można go przechowywać w temperaturze pokojowej. Dzięki glikozylacji lenograstim jest także bardziej odporny na proteolizę i ma większe powinowactwo do receptora na komórkach docelowych [60,91], co powoduje, że aktywność tej postaci G-CSF jest większa w porównaniu do filgrastimu (1 µg filgrastimu odpowiada 100000 jednostek aktywności, natomiast 1 µg lenograstimu jest równoważny z 127750 jednostek aktywności) [91].

## **1.10. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA MOBILIZACJĘ**

W retrospektywnym badaniu przeprowadzonym przez Forda i wsp. obejmującym 201 dorosłych pacjentów z nowotworami nieszpikowego pochodzenia stwierdzono ujemną korelację pomiędzy liczbą przeprowadzonych przed mobilizacją kursów chemioterapii a stężeniem komórek CD34+ w krwi obwodowej w pierwszym dniu aferezy ( $p=0,001$ ). W analizie wieloczynnikowej wykazano, że jedynymi niezależnymi negatywnymi czynnikami predykcyjnymi dla stężenia komórek CD34+ we krwi obwodowej były kursy zawierające pochodne platyny ( $p=0,001$ ) oraz leki alkalinizujące ( $p=0,01$ ) [33].

W niektórych badaniach stwierdzano, że nieefektywna mobilizacja częściej dotyczyła pacjentów, u których mobilizację komórek krwiotwórczych przeprowadzono przy zastosowaniu wyłącznie G-CSF, niż chorych, u których w celu mobilizacji podawano G-CSF po chemioterapii [17].

Egan i wsp. przeprowadzili retrospektywną analizę obejmującą 540 osób, u których przeprowadzono 650 procedur aferezy, stwierdzając istotną korelację pomiędzy aktywnością LDH w surowicy a ilością komórek CD34+ w krwi obwodowej ( $r=0,54$ ,  $p<0,0001$ ) oraz ilością komórek CD34+ zebranych podczas aferezy ( $r=0,51$ ;  $p<0,0001$ ) [27].

### **1.11. POOR MOBILIZERS**

U pewnej grupy pacjentów pod wpływem podawania G-CSF nie udaje się uzyskać wystarczającego wyrzutu komórek progenitorowych do krwi obwodowej [114]. Uznaje się, że minimalna liczba zebranych podczas aferez komórek progenitorowych mogąca zapewnić skuteczne przeszczepienie wynosi wg różnych autorów  $2 \times 10^6$  komórek CD34+ na kg masy ciała pacjenta [65,114] lub  $3 \times 10^6$  komórek CD34+ na kg masy ciała pacjenta [17]. Jako "*poor mobilizers*" definiowani są również pacjenci, u których szczytowe stężenie komórek CD 34+ po stymulacji G-CSF wynosi poniżej  $<20/\mu\text{L}$  [114].

Według danych literaturowych na niepowodzenie mobilizacji mogą mieć wpływ: rozpoznanie podstawowe, zajęcie szpiku kostnego przez chorobę, ilość przebytych kursów chemioterapii, rodzaj zastosowanych leków przeciwnowotworowych [11,17,65]. Jednakże, nie udało się dotąd ustalić jednoznacznych kryteriów pozwalających przewidzieć niepowodzenie mobilizacji.

## **2. CELE PRACY**

Na podstawie dotychczasowej wiedzy o roli G-CSF w mobilizacji komórek krwiotwórczych powstaje pytanie o wpływ dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji.

Pierwszym celem pracy była ocena wpływu różnych dawek G-CSF na skuteczność mobilizacji u różnych szczepów myszy doświadczalnych.

Drugim celem była próba oceny wpływu dawki G-CSF na skuteczność i możliwość optymalnej mobilizacji u dzieci leczonych z powodu różnych chorób onkologicznych i hematologicznych.

Trzecim celem było znalezienie innych czynników wpływających na skuteczność i możliwość optymalnej mobilizacji w grupie obserwowanych pacjentów.

## **3. MATERIAŁ I METODY**

### **3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE**

W eksperymentach wykorzystano szczepy myszy laboratoryjnych Balb/c, DBA, C57BL/6 i CBA hodowane w Zwierzętarni Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Doświadczenia prowadzono w większości w 5 grupach samic myszy, po 4 osobniki w każdej z grup (n=4). Każdy eksperyment mobilizacji i izolacji macierzystych komórek krwiotwórczych przeprowadzono w 2 powtórzeniach, u myszy szczepu Balb/c wykonano 3 powtórzenia, dodając dawkę najwyższą do drugiego i trzeciego.

#### **3.1.2. Ocena ilościowa morfotycznych składników krwi metodą automatyczną**

W celu przeprowadzenia analizy pobrano 80 – 100 µl krwi z żyły ogonowej każdej z myszy. Próbkę rozcieńczono w PBS w stosunku 1:3. Przeprowadzono analizę morfologii krwi za pomocą aparatu KX-21N firmy Sysmex w Pracowni Hematologii Zakładu Biochemii Klinicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

#### **3.1.3. Przygotowanie materiału do badań**

Osobnikom z poszczególnych grup podawano rhG-CSF, filgastrim (Neupogen, Roche, Szwajcaria) podskórnie, w dawkach 25, 100, 500 i 1000 µg/kg masy ciała zwierzęcia w objętości 100 µl przez 5 dni. Odpowiednio dla grupy kontrolnej podawano jałowy PBS w ilości 100 µl. W przypadkach kilku początkowych doświadczeń nie stosowano dawki 1000 µg/kg. W ostatnim dniu doświadczenia, 6 h po podskórnej podaży G-CSF pobierano krew z żyły próżnej dolnej w warunkach jałowych, po uśmierceniu myszy w warunkach zwiększonej koncentracji CO<sub>2</sub>. W otrzymanych próbkach krwi oceniano leukocytozę metodą automatyczną oraz ilość komórek krwiotwórczych cytofluorymetrycznie, a także zakładano hodowlę w celu oceny klonogenności (p. 3.1.5.). Po ocenie ilościowej krew zamrażano w celu wykorzystania do przeszczepienia.

### **3.1.4. Analiza cytofluorymetryczna hematopoetycznych komórek macierzystych**

Krew obwodową pozbawiano krwinek czerwonych metodą lizy z wykorzystaniem buforu litycznego. Po odpłukaniu zawiesiny komórkowej leukocyty zawieszano w buforze PBS z dodatkiem 5% BCS. Do 0,4 ml zawiesiny komórek dodawano po 20 µl przeciwciał i inkubowano 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie (wirowanie 400g, 5 min w objętości 1 ml PBS) i utwalano poprzez zawieszenie w objętości 0,4 ml 1% paraformaldehydu. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane z mysim IgG (kontrola izotypowa) znakowanym tymi samymi fluorochromami co przeciwciała. Barwienie komórek przeciwciałami przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta przeciwciał. Ocenę cytometryczną przeprowadzono w Zakładzie Immunologii Klinicznej Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii CMUJ na cytometrze FACS Canto, Becton-Dickinson.

Bezwzględną liczbę komórek macierzystych przedstawiono jako sumę komórek podwójnie pozytywnych (c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) i komórek c-kit pozytywnych (c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>) w populacji limfoidalnych komórek bez determinanty CD3 (CD3<sup>-</sup>). Komórki te morfologicznie przypominają limfocyty, ale nie są one limfocytami i nie posiadają charakterystycznych dla limfocytów markerów powierzchniowych, przede wszystkim CD3.

Do identyfikacji komórek krwiotwórczych używano przeciwciał produkcji BD Pharmingen, USA: poliklonalne królicze antymysie anty-Sca-1 sprzężone z FITC, poliklonalne królicze antymysie anty-c-Kit-R znakowane PE. Dodatkowo dla wyeliminowania populacji limfocytów CD3<sup>+</sup>, które morfologicznie są zbliżone do HSC u myszy stosowano przeciwciało monoklonalne szczurze antymysie anty-CD3 (BD Pharmingen, USA) znakowane PE-Cy-5.

### **3.1.5. Zakładanie klonogenności**

Hodowle komórkowe na podłożu półpłynnym przeprowadzono w celu oceny wydajności proliferacji mobilizowanych komórek macierzystych w warunkach in vitro.

Wszystkie etapy doświadczenia zostały przeprowadzone w warunkach jałowych. Procedurę powtórzono dla każdej z grup mobilizowanej krwi. Do probówek Eppendorf o pojemności 2 ml dodano po 1 ml medium hodowlanego MethoCult GF 3434 firmy Stem Cells Technologies i odpowiednią ilość komórek, tak aby wysiewana mieszanina liczyła około 1 mln komórek. Komórki z poszczególnych osobników łączono w obrębie każdej z badanych grup i wysiewano na płytkę do 2 studzienek (w 2 powtórzeniach), po 1 ml do każdej z osobna. Studzienki sąsiadujące wypełniono PBS, w celu zapobiegnięcia wyschnięcia hodowli.

Hodowlę komórek prowadzono w cieplarni w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% wilgotności, przez 10-14 dni. Po tym czasie analizowano wzrost komórek na płytkach przy użyciu mikroskopu świetlnego. Kolonie liczono i klasyfikowano na podstawie różnic morfologicznych w obu studzienkach, wynik przedstawiono jako sumę z obu studzienek.

### **3.1.6. Zamrażanie komórek**

Komórki zamrażano w celu wykorzystania ich do syngenicznego przeszczepu. Pelet komórek zawieszony w PBS wirowano przy prędkości 200 g przez 8 minut, po czym dokładnie odciągnięto nadsącz. Powstały pelet zawieszano w 900 µl mieszaniny mrożeniowej (70% RPMI 1640 firmy PAA Laboratory, 20% FBS, 10% DMSO) i przenoszono do probówek polipropylenowych do głębokiego zamrażania Sarstedt CryoPure o pojemności 1,6 ml. Wszystkie probówki niezwłocznie umieszczono w zamrażarce o temperaturze -80°C, po czym przechowywano w parach ciekłego azotu.

### **3.1.7. Przeszczepianie macierzystych komórek krwiotwórczych**

Myszy poddano zabiegowi subletalnego napromienienia całego ciała dzień przed przeszczepem (dzień -1). Zwierzęta otrzymały dawkę 816 cGY podzieloną na 2 części, odpowiednio 401 cGY i 415 cGY, podaną w odstępach 4 godzinnych. Zabieg przeprowadzono przy użyciu aparatu Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion).

Probówki umieszczone w parach ciekłego azotu przenoszono do zamrażarki o temperaturze -80°C. Po upływie 1 godziny materiał umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na okres 5 minut. Następnie zawartość probówek do głębokiego

zamrażania przenoszono do probówek wirówkowych o pojemności 50 ml, dopełniając mieszaniną PBS + 3% FBS do 20 ml. Tak przygotowany roztwór poddawano wirowaniu z prędkością 160 g przez okres 8 minut. Po tym czasie zlano nadsącz i powtórzono procedurę płukania i wirowania. Powstały pelet zawieszono w 1 ml mieszaniny PBS + 3% FBS. Procedurę powtórzono oddzielnie dla każdej z grup.

Dokonano ponownego pomiaru liczebności komórek przy pomocy hemocytometru, w celu przygotowania odpowiednich objętości mieszaniny macierzystych komórek krwiotwórczych i PBS + 3% FBS, w taki sposób, by w 100  $\mu$ l mieszaniny znajdował się 1 mln komórek. Myszy otrzymały po 150  $\mu$ l mieszaniny w postaci iniekcji do splotu żylnego zagałkowego.

Hodowla prowadzona była w Zwierzętarńi Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie w warunkach pełnej sterylności. Myszy przebywały w jałowych klatkach, otrzymywały jałową paszę i wodę z dodatkiem antybiotyku (amoksycyliny z kwasem klawulanowym w ilości 2,4g/l). W 4, 7 i 11 dniu po przeszczepie pobierano 80 – 100  $\mu$ l krwi z ogona każdej z myszy w celu przeprowadzenia ilościowej oceny morfotycznych składników krwi. Próbki rozcieńczono w PBS w stosunku 1:3. Przeprowadzono analizę morfologii krwi za pomocą aparatu KX-21N firmy Sysmex. W 11 dniu po przeszczepieniu myszy uśmiercono w warunkach zwiększonej koncentracji CO<sub>2</sub>. Przeprowadzono sekcję, podczas której wypreparowano śledziony w celu dokonania identyfikacji i liczenia kolonii śledzionowych. Narządy utrwalono w roztworze Tellysynchronicznego (70% etanol 1000 ml, 37 – 40% formalina 50 ml, lodowaty kwas octowy 50 ml).

### **3.1.8. Analiza statystyczna**

W analizie statystycznej wykorzystano pakiet Statistica 8.0. Zastosowano test ANOVA Kruskala-Wallisa, test mediany oraz test Scheffego. Jako istotne statystycznie uznano wartości  $p < 0,05$ . Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.



### 3.2. PACJENCI I METODY

Analizę retrospektywną przeprowadzono u 82 pacjentów kierowanych do wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej przeszczepieniem autologicznych komórek krwiotwórczych, u których w latach 2002-2010 wykonano 89 mobilizacji za pomocą chemioterapii i G-CSF (CHT + G-CSF) lub tylko G-CSF oraz 150 separacji mobilizowanych komórek krwiotwórczych z krwi obwodowej. Dane kliniczne pacjentów przedstawiono w tabelach 3.1 i 3.3.

Pacjenci byli kwalifikowani do wysokodawkowanej terapii wspomaganej przeszczepieniem autologicznych komórek krwiotwórczych z krwi z powodu złego rokowania w różnych chorobach onko-hematologicznych, w tym w 4 przypadkach z powodu wznowy choroby podstawowej. Przed mobilizacją wszyscy pacjenci byli poddani kompleksowej terapii, na którą składało się leczenie chirurgiczne oraz wielolekowa chemioterapia typowa dla określonego schorzenia wg różnych uznanych międzynarodowych protokołów, a 17 pacjentów dodatkowo otrzymało miejscową radioterapię. Mobilizację prowadzono wg dwóch sposobów: za pomocą tylko G-CSF; lub G-CSF podawano w fazie osiągnięcia najniższych wartości leukocytozy (nadir) po uprzedniej chemioterapii wg programu typowego dla danej choroby, pod warunkiem, że jej skład zawierał tzw. mobilizujące chemioterapeutyki. G-CSF był podawany podskórnie, 1 - 2 razy na dobę, w dawkach od 5 do 24  $\mu\text{g}/\text{kg m.c.}/\text{dobę}$ . Dawki G-CSF stosowane w poszczególnych grupach pacjentów przedstawiono w tabeli 3.2. Dane dotyczące szczegółów procedury drugiego cyklu mobilizacji przedstawiono w tabeli 3.3. Dla pacjentów mobilizowanych ze stanu „*steady state*” pierwszym dniem separacji był zwykle piąty dzień podawania G-CSF, jeżeli liczba komórek CD34+ we krwi wynosiła  $>10/\mu\text{l}$ , a dla mobilizowanych za pomocą CHT + G-CSF dzień, w którym liczba komórek CD34+ we krwi była  $>10/\mu\text{l}$ . Separację przeprowadzono za pomocą separatora komórkowego Baxter Fenwal CS3000 Plus. Dla pacjentów z masą ciała  $<15$  kg wprowadzono modyfikację protokołu aferezy polegającą na wypełnieniu przed

procedurą przestrzeni martwej drenów separatora koncentratem krwinek czerwonych oraz ograniczenie szybkości przepływu krwi do 20 ml/min. Każdorazowo objętość opracowanej krwi wynosiła średnio 3 (od 1,5 do 4,5) objętości krwi krążącej pacjenta, tj. średnio 5000 (od 2000 do 12000 ml).

Wiek (miesiące): średnia; mediana (zakres)		102; 96 (15-249)
Płeć	dziewczynki	38 (46%)
	chłopcy	44 (54%)
Rozpoznanie	zwojak zarodkowy	42 (51 %)
	mięsak Ewinga	16 (20 %)
	chłoniak nieziarniczny	8 (10 %)
	guz mózgu	7 (9 %)
	ziarnica złośliwa	5 (6 %)
	yolk sac tumor	1
	ostra białaczka limfoblastyczna	1
	nerczak zarodkowy	1
	rak zarodkowy jądra	1
Czas od rozpoznania do mobilizacji (miesiące): średnia; mediana (zakres)		14; 6 (2-116)
	< 6 miesięcy	38
	6-12 miesięcy	23
	>12 miesięcy	21
Masa ciała	<15 kg	25 (30%)
	≥15 kg	57 (70%)

Tabela 3.1 Charakterystyka pacjentów

Miarą skuteczności protokołu mobilizacji i separacji była możliwość kolekcji komórek CD34+ w liczbie  $>2 \times 10^6/\text{kg}$  m.c. biorcy (optymalnie  $>3 \times 10^6/\text{kg}$ ). Jako

niepowodzenie mobilizacji przyjmowano sytuację w której wyjściowo nie uzyskano  $>10/\mu\text{l}$  krwi komórek CD34+ lub nie udało się zebrać  $>2 \times 10^6/\text{kg}$  m.c. biorcy komórek CD34+ w trakcie maksymalnie 4 dni aferezy. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.

		Tylko G-CSF (n=56; 68%)	CHT + G-CSF (n=26; 32%)
Dobowa dawka G-CSF	$\leq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	5	19
	11-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	16	2
	$>20 \mu\text{g}/\text{kg}$	34	4
	inny schemat	1*	1*

Tabela 3.2 Schematy pierwszego cyklu mobilizacji.

\* dawka G-CSF wzrastała w trakcie mobilizacji z 15 do 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  m.c./dobę,

G-CSF – czynnik wzrostu dla granulocytów; CHT – chemioterapia;

Rozpoznanie	zwojak zarodkowy	3
	mięsak Ewinga	3
	guz mózgu	1
Schemat mobilizacji	G-CSF 2 x 12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$	6
	CHT+G-CSF G-CSF 2 x 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$	1
Czas od rozpoznania do mobilizacji (miesiące): średnia; mediana (zakres)		6; 5 (4-11)

Tabela 3.3 Charakterystyka pacjentów i schemat drugiego cyklu mobilizacji.

G-CSF – czynnik wzrostu dla granulocytów; CHT – chemioterapia

### **3.2.1 Analiza statystyczna**

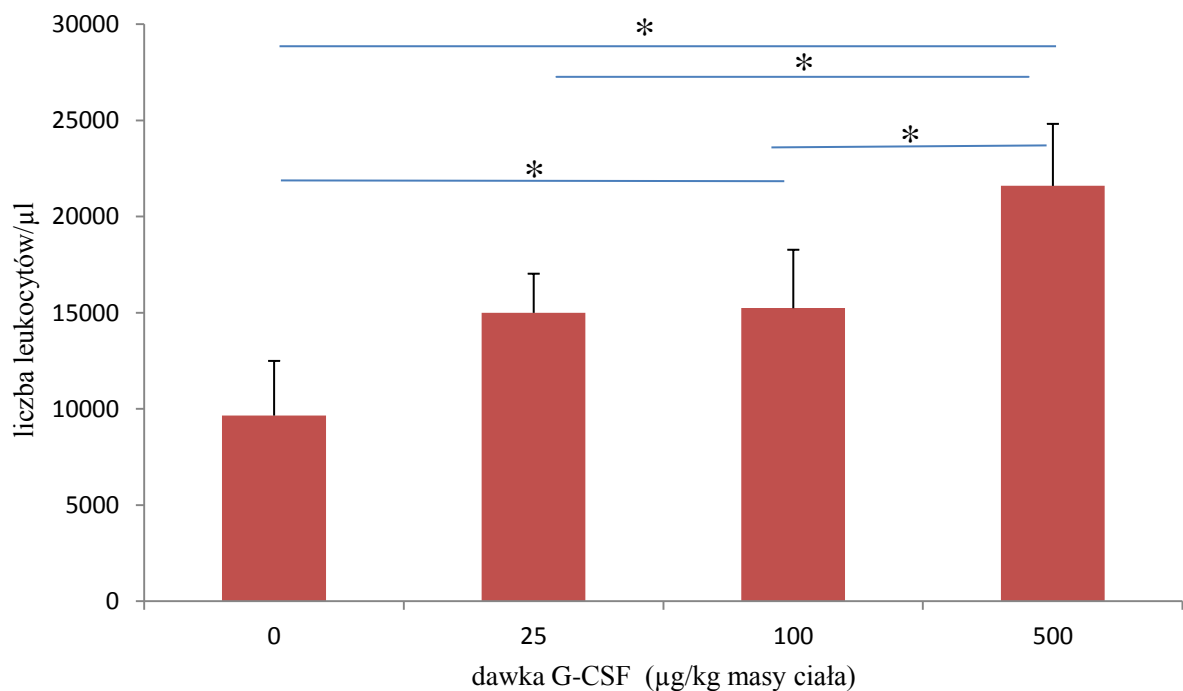
Skuteczność mobilizacji komórek krwiotwórczych w grupie pacjentów otrzymujących G-CSF oraz CHT + G-CSF analizowano za pomocą oprogramowania STATISTICA. Wykorzystano test Chi2 z poprawką Yatesa dla wartości o rozkładzie zmiennym oraz test U-Mann-Whitney dla wartości o rozkładzie ciągłym. Jako istotne statystycznie uznano wartości  $p < 0,05$ . W analizie wieloczynnikowej zastosowano uogólnioną regresję logistyczną wykorzystując program SAS.

## 4. WYNIKI - CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 4.1. BALB/C

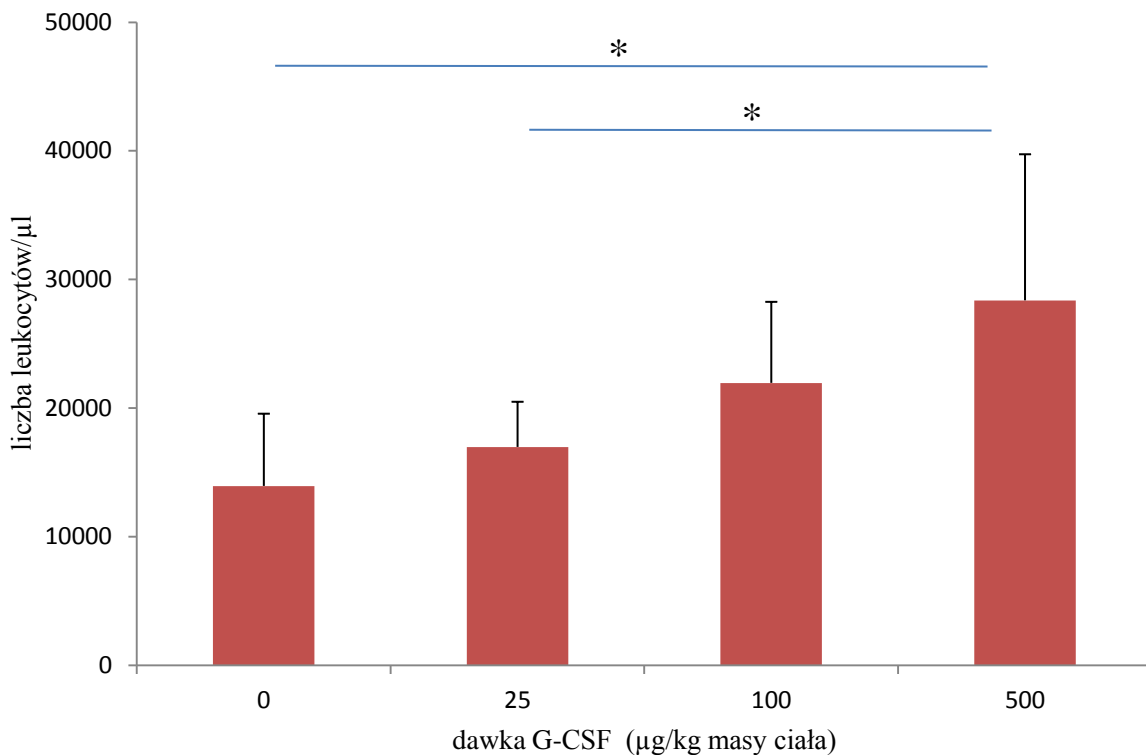
#### 4.1.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF.

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu Balb/c leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $9660 \pm 2840$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100 i 500  $\mu\text{g}$  G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiednio:  $15000 \pm 2034$ ,  $15240 \pm 3040$  oraz  $21600 \pm 3224$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ . Stwierdzono statystycznie istotne różnice leukocytozy pomiędzy grupami mobilizowanymi dawką 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a grupami 0, 25 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a także pomiędzy grupą kontrolną a dawką 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.1



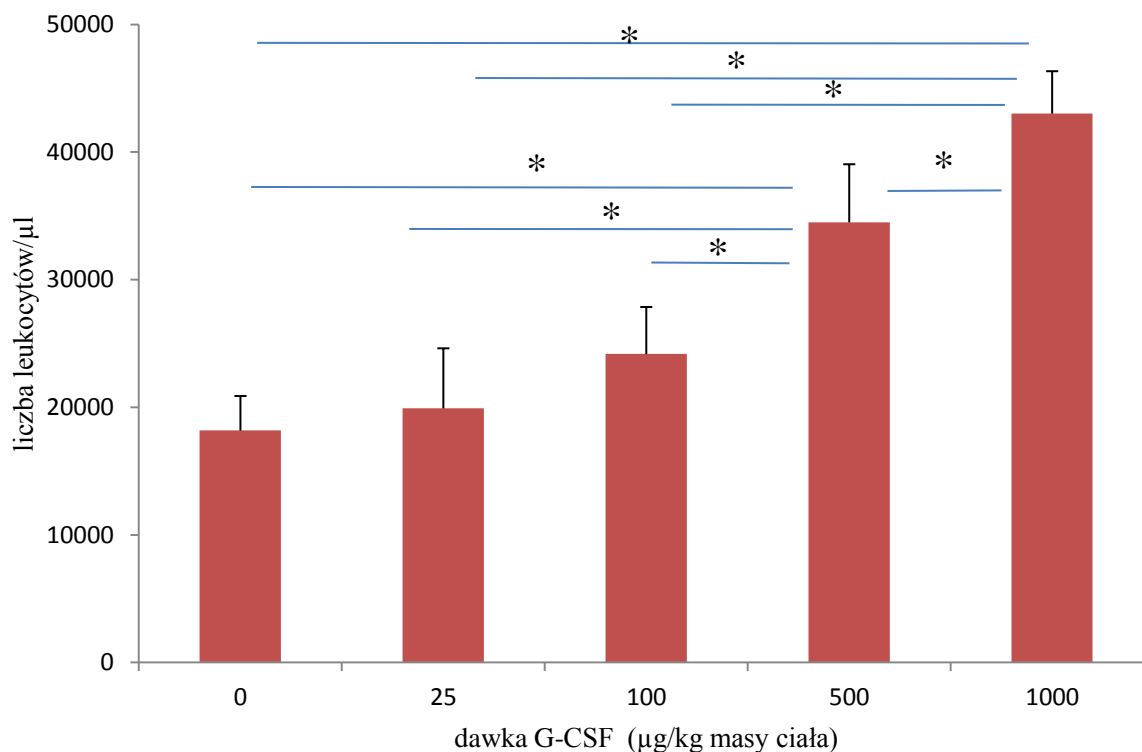
Wykres 4.1 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 1, \*  $p < 0,05$ ).

W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu Balb/c leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $13950 \pm 1212$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100 i 500  $\mu\text{g}$  G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiednio:  $16980 \pm 6720$ ,  $21960 \pm 3930$  oraz  $28380 \pm 7702$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ . Stwierdzono statystycznie istotne różnice leukocytozy pomiędzy grupami mobilizowanymi dawką 0 i 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a dawką 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.2



Wykres 4.2 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 2, \* $p < 0,05$ ).

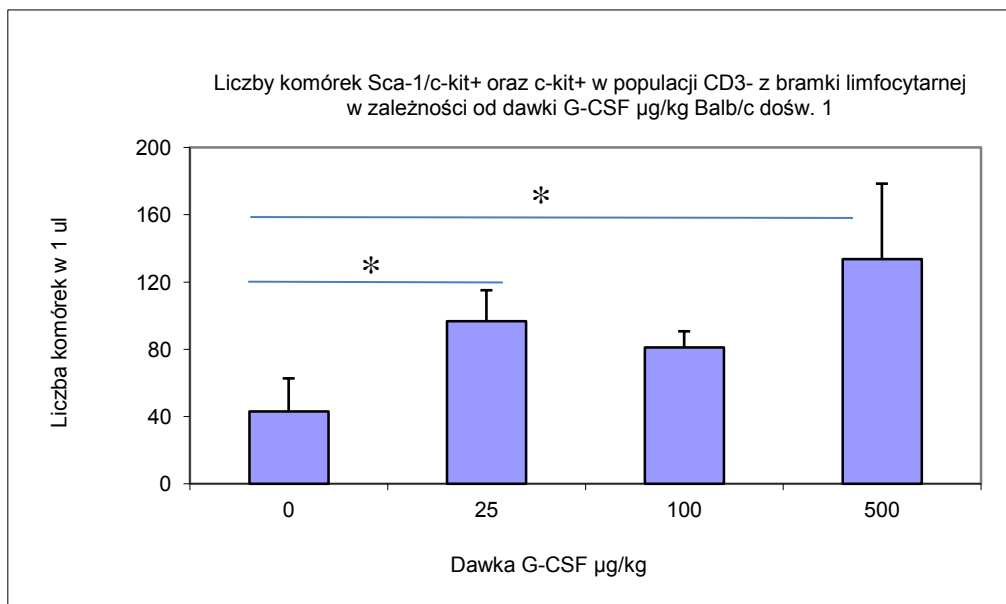
W doświadczeniu nr 3 u myszy szczepu Balb/c leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $18180 \pm 2704$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawki G-CSF 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  masy ciała wyniosła  $19920 \pm 4712$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ , dla dawki 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  -  $24180 \pm 3690$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ , dla dawki 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  -  $34500 \pm 4554$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  i dla dawki 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  -  $43020 \pm 3324$ . Statystycznie istotnie różniły się leukocytozy między grupami 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a wszystkimi pozostałymi grupami. Dane przedstawiono na wykresie 4.3



Wykres 4.3 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 3, \*  $p < 0,05$ ).

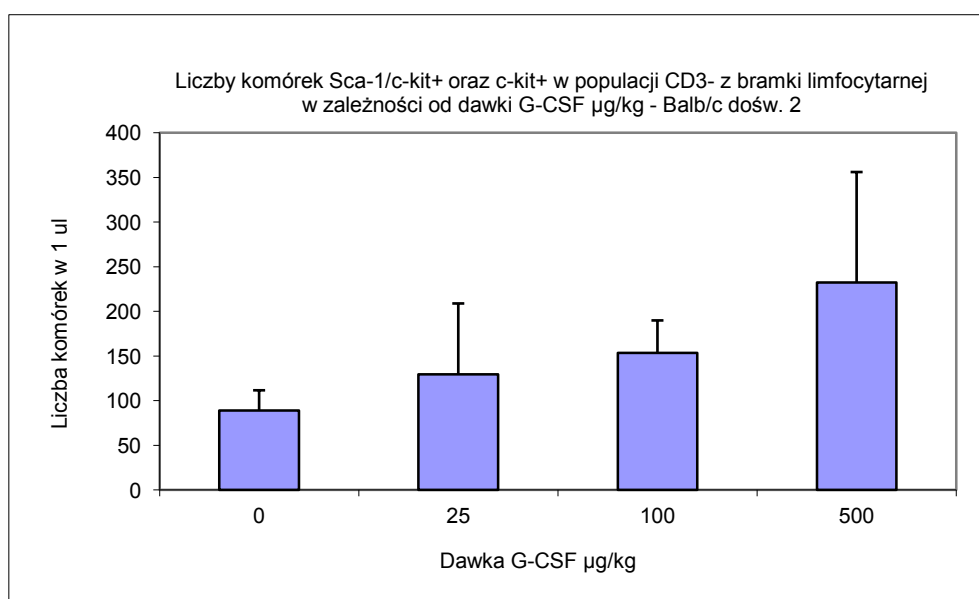
#### 4.1.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G-CSF

W doświadczeniu nr 1 (Wykres 4.4) liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $43 \pm 20$  komórek w 1  $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. W przypadku dawek G-CSF 25, 100 i 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , liczba komórek wynosiła odpowiednio  $96 \pm 18$ ,  $81 \pm 10$  i  $134 \pm 44$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Istotną statystycznie różnicę stwierdzono pomiędzy grupą kontrolną a grupami mobilizowanymi dawkami 25 i 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



Wykres 4.4 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 1, \* $p < 0,05$ )

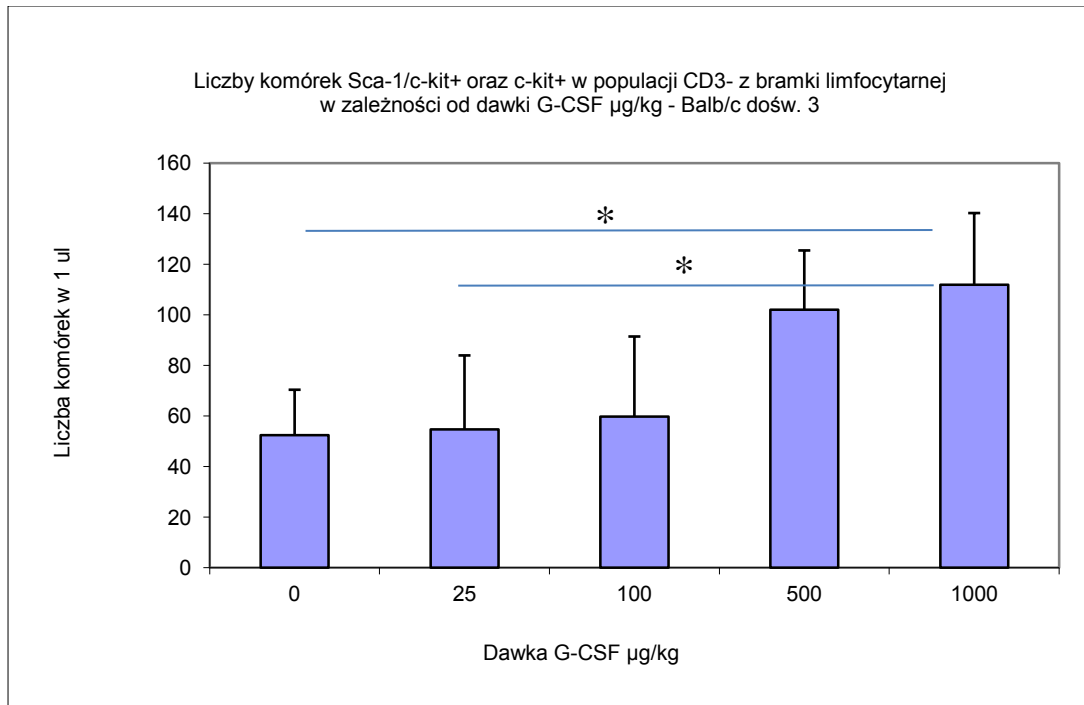
W doświadczeniu nr 2 liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $89 \pm 22$  komórek w 1 µl krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100 i 500 µg G-CSF, liczba komórek wynosiła odpowiednio  $129 \pm 80$ ,  $154 \pm 36$  i  $232 \pm 124$  komórek/µl. Różnice nie były istotne statystycznie. Dane przedstawiono na wykresie 4.5.



Wykres 4.5 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 2)



W doświadczeniu nr 3 liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $52 \pm 9$  komórek w 1  $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  liczba komórek wynosiła odpowiednio  $55 \pm 30$ ,  $60 \pm 32$ ,  $102 \pm 24$  i  $112 \pm 28$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Różnice istotne statystycznie obserwowano między grupami 0 a 1000 oraz 25 a 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.6.



Wykres 4.6 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 3, \* $p < 0,05$ )

#### 4.1.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* (CFU Assay)

W doświadczeniu 1 (Tabela 4.1) w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 11 jednostek tworzących kolonie CFU – G (ang. *colony forming unit – granulocyte*), jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU – E (ang. *burst forming unit – erythroid*) oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  zaobserwowano wzrost 16 jednostek tworzących kolonie. Dawka 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  G-CSF spowodowała wzrost 12 jednostek tworzących kolonie, z kolei dla dawki 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  stwierdzono znaczny wzrost jednostek – łącznie 29 jednostek, z wyraźnym wzrostem ilości jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU – E. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.1.

Dawka G-CSF	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
$\mu\text{g}/\text{kg m.c.}$	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	3	2	6	<b>11</b>
<b>25</b>	9	1	6	<b>16</b>
<b>100</b>	8	1	3	<b>12</b>
<b>500</b>	12	12	5	<b>29</b>

Tabela 4.1 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 1.

W doświadczeniu nr 2 w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 11 jednostek tworzących kolonie CFU – G, jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU – E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  zaobserwowano wzrost 13 jednostek tworzących kolonie. Dawka 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  G-CSF spowodowała wzrost 17 jednostek tworzących kolonie, natomiast dla dawki 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  stwierdzono wzrost łącznie 29 jednostek, podobnie jak w doświadczeniu nr 1 z wyraźnym wzrostem ilości jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU – E. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.2.

Dawka G-CSF	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
$\mu\text{g}/\text{kg m.c.}$	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	3	2	6	<b>11</b>
<b>25</b>	8	2	3	<b>13</b>
<b>100</b>	9	2	6	<b>17</b>
<b>500</b>	12	12	5	<b>29</b>

Tabela 4.2 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 2.

W doświadczeniu 3 u szczepu myszy Balb/c w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 11 jednostek tworzących kolonie CFU–G, jednostek tworzące skupiska erytrocytów BFU – E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki

G-CSF 25 µg/kg zaobserwowano wzrost 16 jednostek tworzących kolonie. Dawka 100 µg/kg G-CSF spowodowała wzrost 20 jednostek tworzących kolonie, natomiast dla dawek 500 i 1000 µg/kg stwierdzono łącznie wzrost odpowiednio 47 i 49 jednostek. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.2.

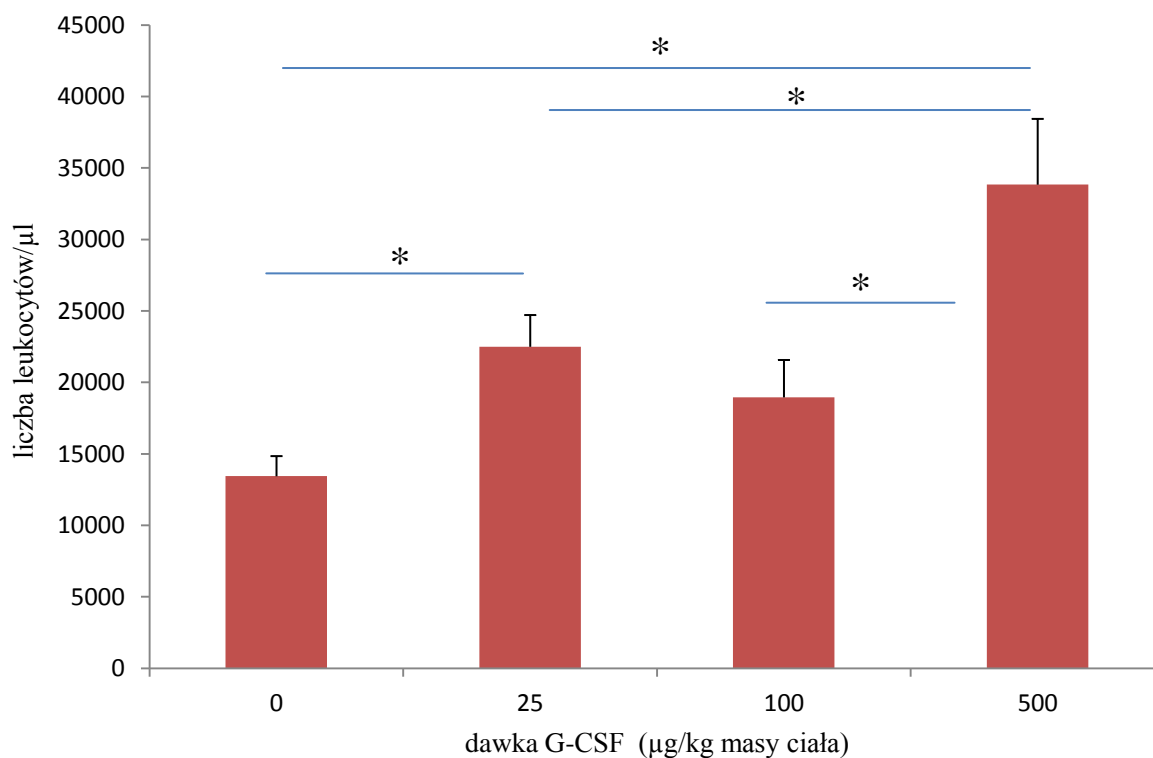
Dawka G-CSF µg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	6	4	1	<b>11</b>
<b>25</b>	8	3	5	<b>16</b>
<b>100</b>	10	8	2	<b>20</b>
<b>500</b>	24	19	4	<b>47</b>
<b>1000</b>	28	17	4	<b>49</b>

Tabela 4.3 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 3.

## 4.2. DBA

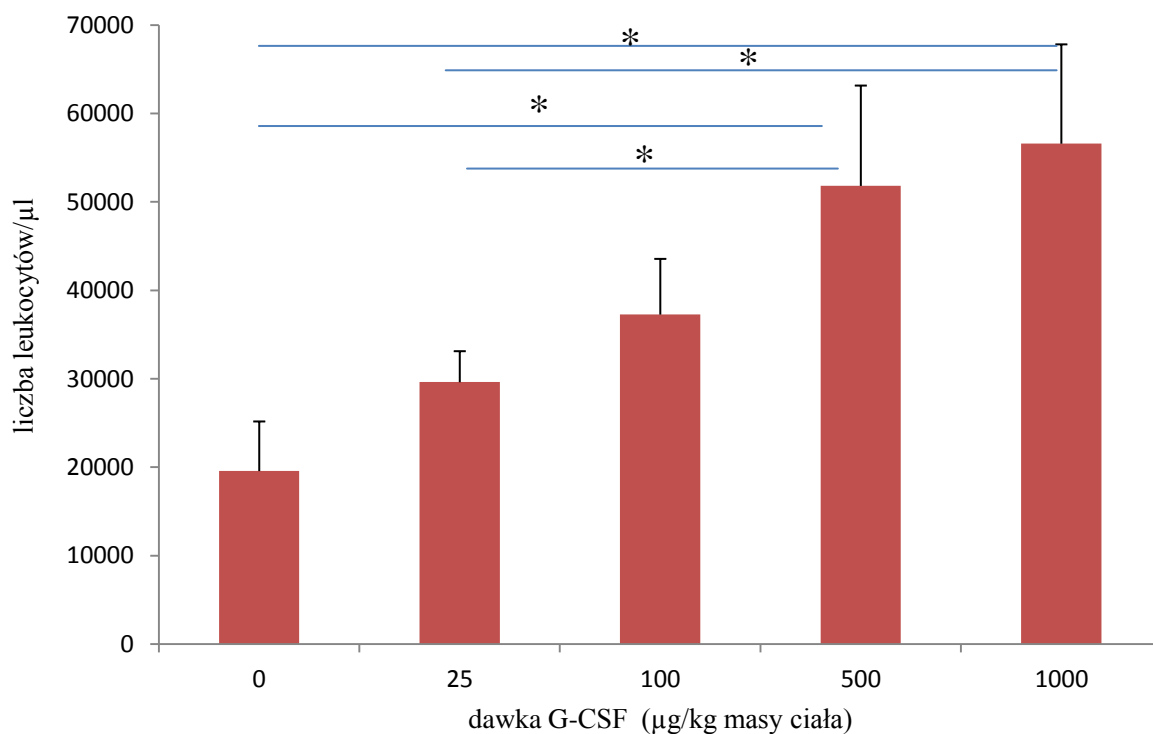
### 4.2.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF.

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu DBA leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $13440 \pm 1413$  leukocytów/ $\mu$ l krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100 i 500 µg G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiednio:  $22250 \pm 2224$ ,  $18960 \pm 2619$  oraz  $33840 \pm 4606$  leukocytów/ $\mu$ l. Stwierdzono statystycznie istotne różnice leukocytozy pomiędzy grupami mobilizowanymi dawką 0 a dawką 25 µg/kg, a także pomiędzy grupą 500 a pozostałymi grupami. Dane przedstawiono na wykresie 4.7.



Wykres 4.7 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu DBA w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 1, \* $p < 0,05$ ).

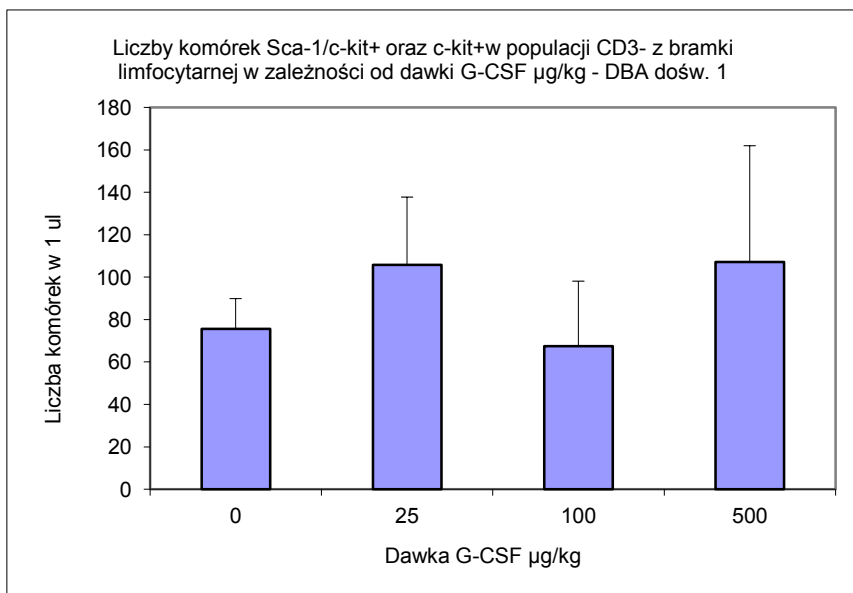
W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu DBA, podobnie jak w przypadku szczepu Balb/c dodano kolejną dawkę mobilizacyjną - 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $19575 \pm 5614$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}$  G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiedni:  $29625 \pm 3510$ ,  $37275 \pm 6299$ ,  $51825 \pm 11351$  i  $56600 \pm 11235$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ . Statystycznie istotnie różniły się leukocytozy między grupą 500 a grupą 0 i 25, oraz 1000 a 0 i 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.8.



Wykres 4.8 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu DBA w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 2, \* $p < 0,05$ ).

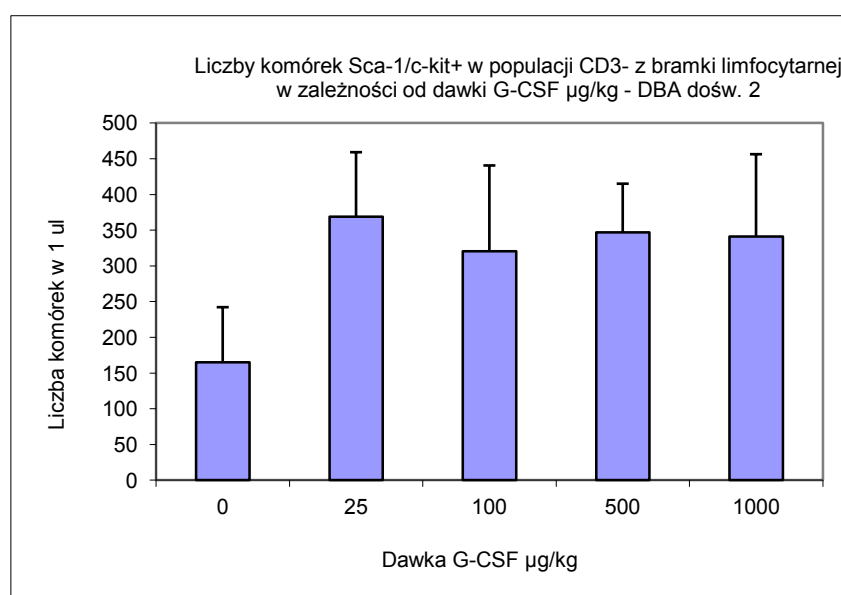
#### 4.2.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G - CSF

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu DBA liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $76 \pm 14$  komórek w  $1 \mu\text{l}$  krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100 i 500  $\mu\text{g}$  G-CSF, liczba wynosiła odpowiednio  $106 \pm 32$ ,  $67 \pm 30$  i  $107 \pm 54$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. Wyniki doświadczenia przedstawia wykres 4.9.



Wykres 4.9 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy DBA (doświadczenie 1)

W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu DBA (Wykres 4.10) liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $165 \pm 72$  komórek w 1 µl krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100 i 500 µg G-CSF, liczba komórek wynosiła odpowiednio  $369 \pm 90$ ,  $320 \pm 120$  i  $341 \pm 115$  komórek/µl. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.



Wykres 4.10 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy DBA (doświadczenie 2)

#### 4.2.3 Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* (CFU Assay)

W przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 5 jednostek tworzących kolonie CFU - G, jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU - E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  zaobserwowano wzrost 16 jednostek tworzących kolonie. Dawka 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  G-CSF spowodowała wzrost 15 jednostek tworzących kolonie, z kolei dla dawki 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  stwierdzono wzrost łącznie 31 jednostek, z wyraźnym wzrostem ilości jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU - E. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.4.

Dawka G-CSF $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
<b>0</b>	2	1	2	<b>5</b>
<b>25</b>	7	2	7	<b>16</b>
<b>100</b>	7	3	5	<b>15</b>
<b>500</b>	11	11	9	<b>31</b>

Tabela 4.4 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu DBA - doświadczenie 1.

W doświadczeniu 2 u szczepu myszy DBA w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 9 jednostek tworzących kolonie CFU-G, jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU - E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  zaobserwowano wzrost ilości jednostek tworzących kolonie do 26. Dawka 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  G-CSF spowodowała wzrost 31 jednostek tworzących kolonie, z kolei dla dawki 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  stwierdzono wzrost odpowiednio 36 i 37 jednostek. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.2.

Dawka G-CSF μg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	2	4	3	<b>9</b>
<b>25</b>	10	10	4	<b>26</b>
<b>100</b>	15	15	1	<b>31</b>
<b>500</b>	16	22	2	<b>36</b>
<b>1000</b>	17	19	3	<b>37</b>

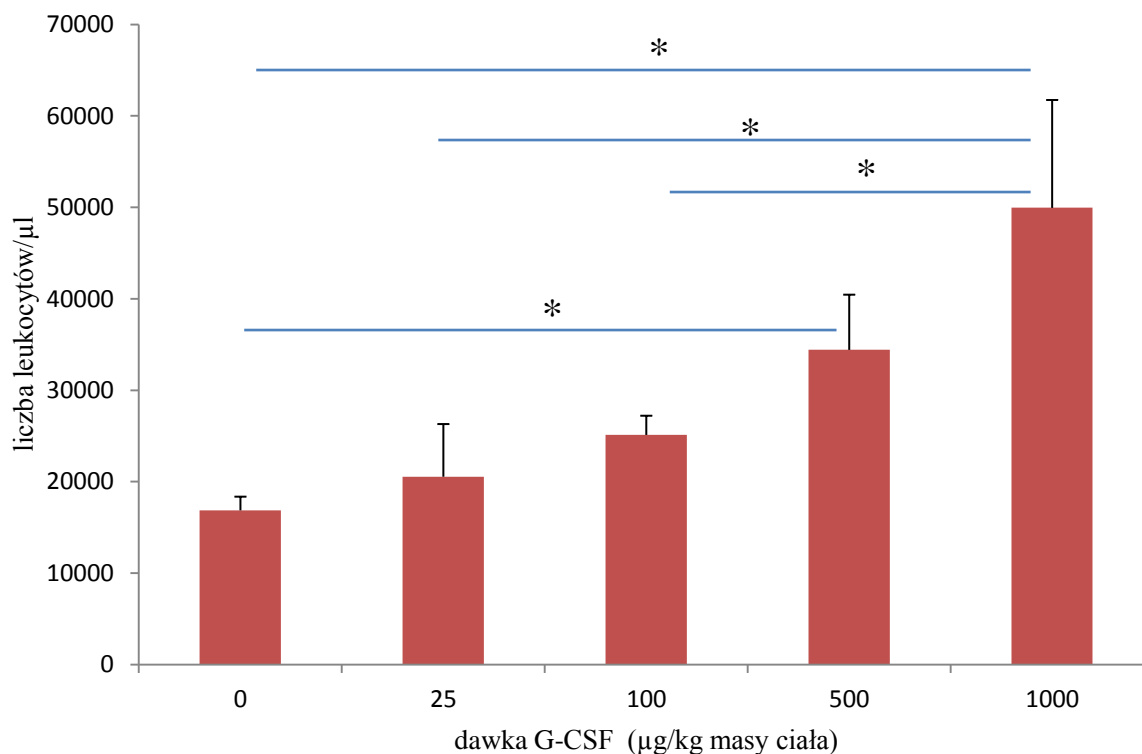
Tabela 4.5 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu DBA - doświadczenie 2.

### 4.3. C57BL/6

#### 4.3.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF.

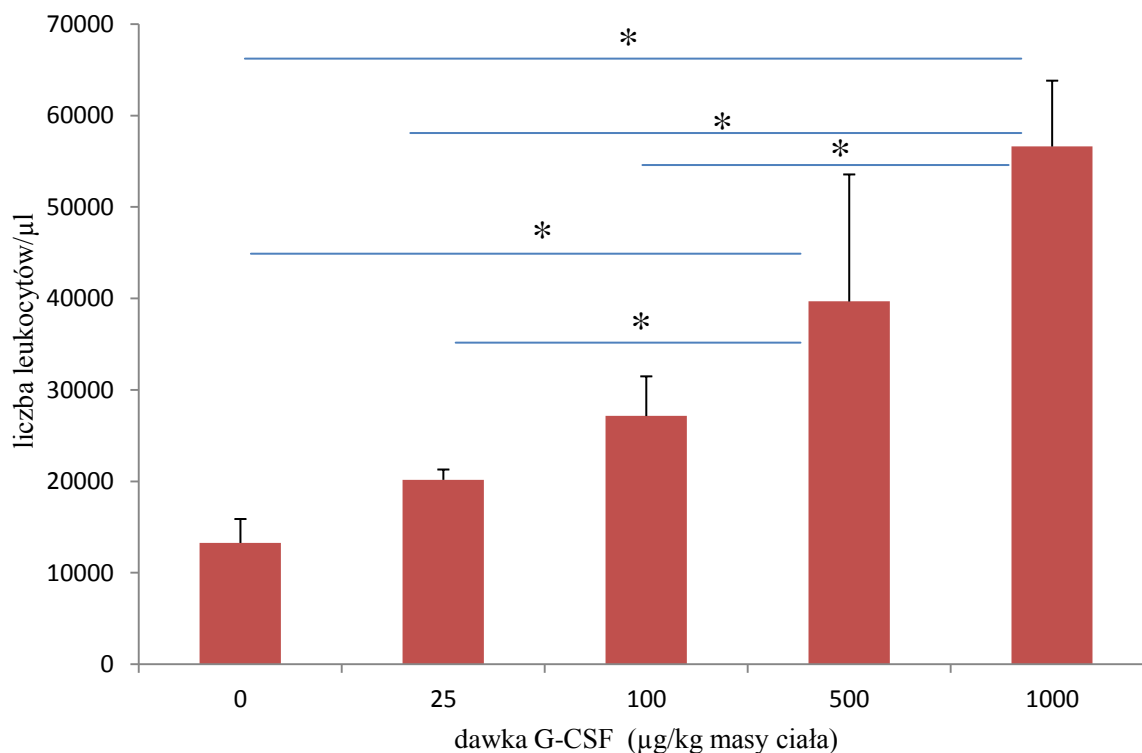
W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu C57BL/6 leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $16875 \pm 1497$  leukocytów/ $\mu$ l krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100, 500 i 1000  $\mu$ g G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiednio:  $20550 \pm 5763$ ,  $25125 \pm 2098$ ,  $34425 \pm 6037$  i  $49950 \pm 11799$  leukocytów/ $\mu$ l. Statystycznie istotnie różniły się leukocytozy między grupą 500 a grupą 0, oraz 1000 a 0, 25 i 100  $\mu$ g/kg. Dane przedstawiono na wykresie 4.11.





Wykres 4.11 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu C57BL/6 w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 1, \*  $p < 0,05$ ).

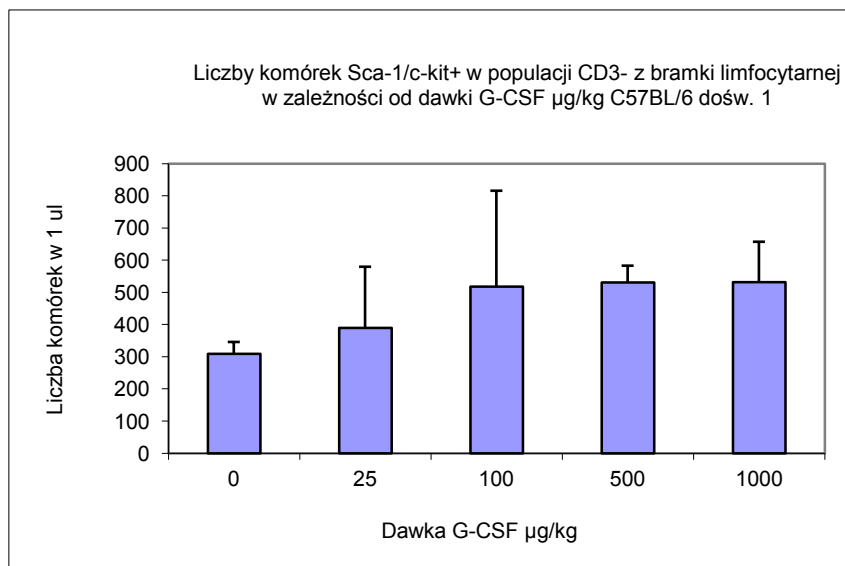
W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu C57BL/6 leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $13275 \pm 2620$  leukocytów/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawek 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}$  G-CSF/kg masy ciała leukocytoza wynosiła odpowiednio:  $20175 \pm 1132$ ,  $27150 \pm 4344$ ,  $39675 \pm 13898$  i  $56625 \pm 7202$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ . Statystycznie istotnie różniły się leukocytozy między grupą 500 a grupą 0 i 25, oraz 1000 a 0, 25 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.12.



Wykres 4.12 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu C57BL/6 w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 2, \* $p < 0,05$ ).

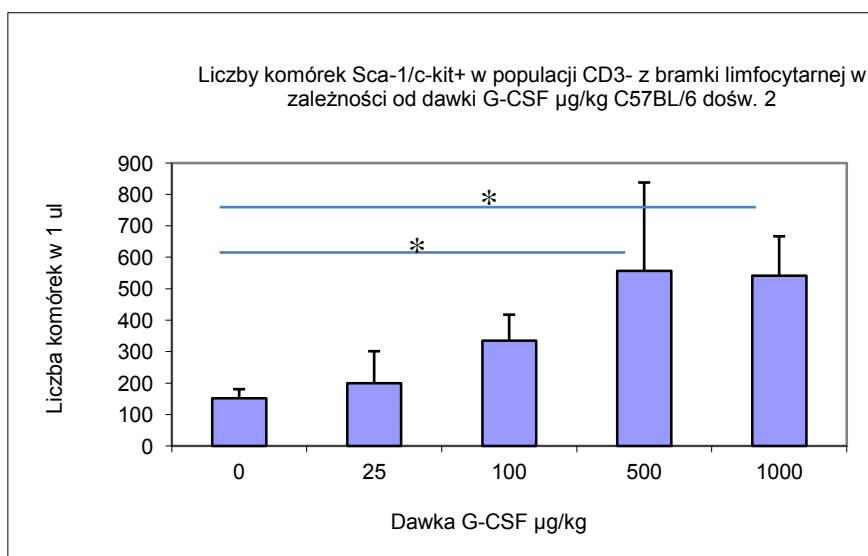
#### 4.3.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G - CSF

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu C57BL/6 liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $309 \pm 37$  komórek w 1  $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}$  G-CSF, liczba komórek wynosiła odpowiednio  $389 \pm 190$ ,  $518 \pm 298$  i  $530 \pm 53$  i  $531 \pm 126$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. Dane przedstawiono na wykresie 4.13.



Wykres 4.13 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy C57BL/6 (doświadczenie 1)

W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu C57BL/6 liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $159 \pm 29$  komórek w 1 µl krwi obwodowej. W przypadku dawek 25, 100, 500 i 1000 µg G-CSF/kg, liczba komórek wynosiła odpowiednio  $200 \pm 102$ ,  $335 \pm 83$  i  $556 \pm 282$  i  $541 \pm 126$  komórek/µl. Grupy mobilizowane dawką 500 i 1000 µg /kg różniły się istotnie od grupy kontrolnej. Dane przedstawiono na wykresie 4.14.



Wykres 4.14 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy C57BL/6 (doświadczenie 2, \* $p < 0,05$ )

#### 4.3.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* (CFU Assay)

W doświadczeniu 1 u szczepu myszy C57BL/6 w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 9 jednostek tworzących kolonie CFU-G, jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU - E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25 µg/kg zaobserwowano wzrost 18 jednostek tworzących kolonie. Dawka 100 µg/kg G-CSF spowodowała wzrost 29 jednostek tworzących kolonie, z kolei dla dawek 500 i 1000 µg/kg stwierdzono wzrost po 31 jednostek. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.6.

Dawka G-CSF µg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	<b>Suma</b>
<b>0</b>	8	1	-	<b>9</b>
<b>25</b>	12	6	-	<b>18</b>
<b>100</b>	15	12	2	<b>29</b>
<b>500</b>	20	10	1	<b>31</b>
<b>1000</b>	19	10	2	<b>31</b>

Tabela 4.6 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu C57BL/6 - doświadczenie 1.

W doświadczeniu 2 u szczepu myszy C57BL/6 w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost łącznie 12 jednostek tworzących kolonie CFU-G, jednostek tworzących skupiska erytrocytów BFU - E oraz jednostek mieszanych. Dla dawki G-CSF 25 µg/kg zaobserwowano wzrost ilości jednostek tworzących kolonie do 35. Dawka 100 µg/kg G-CSF spowodowała wzrost 34 jednostek tworzących kolonie, natomiast dla dawek 500 i 1000 µg/kg stwierdzono wzrost po 36 jednostek. Szczegółowe dane przedstawia tabela 4.7

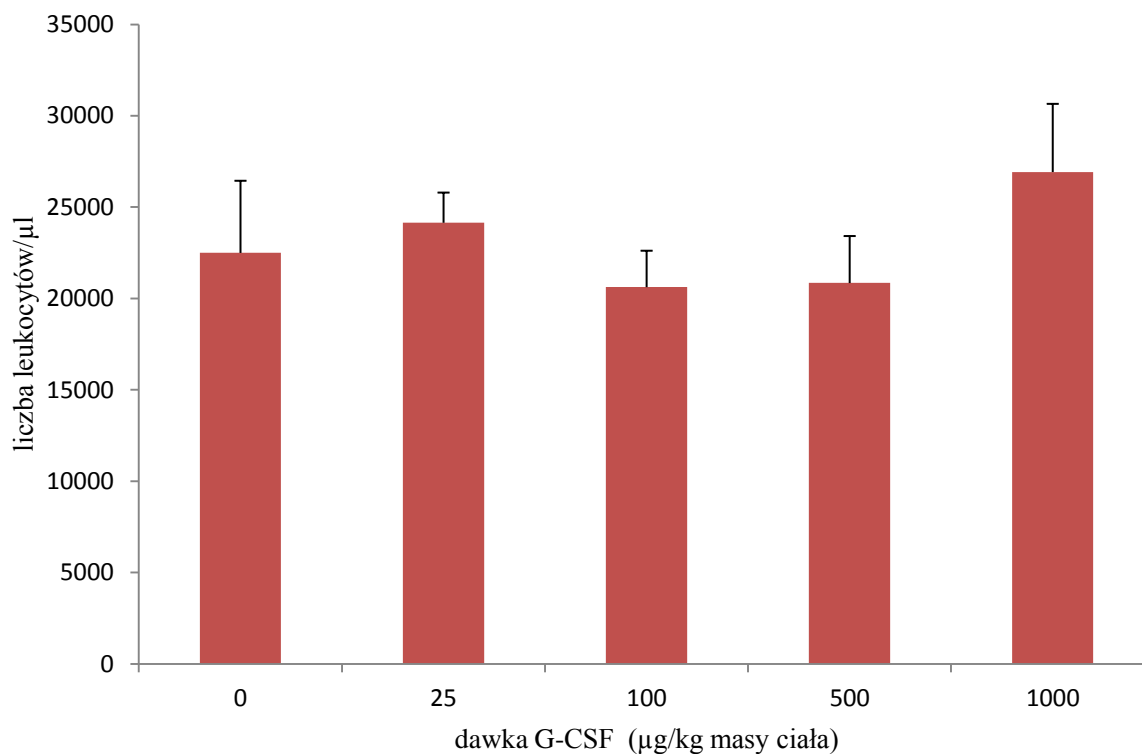
Dawka G-CSF µg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	11	1	-	<b>12</b>
<b>25</b>	27	8		<b>35</b>
<b>100</b>	22	11	1	<b>34</b>
<b>500</b>	24	11	1	<b>36</b>
<b>1000</b>	23	10	3	<b>36</b>

Tabela 4.7 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu C57BL/6 - doświadczenie 2.

#### 4.4. CBA

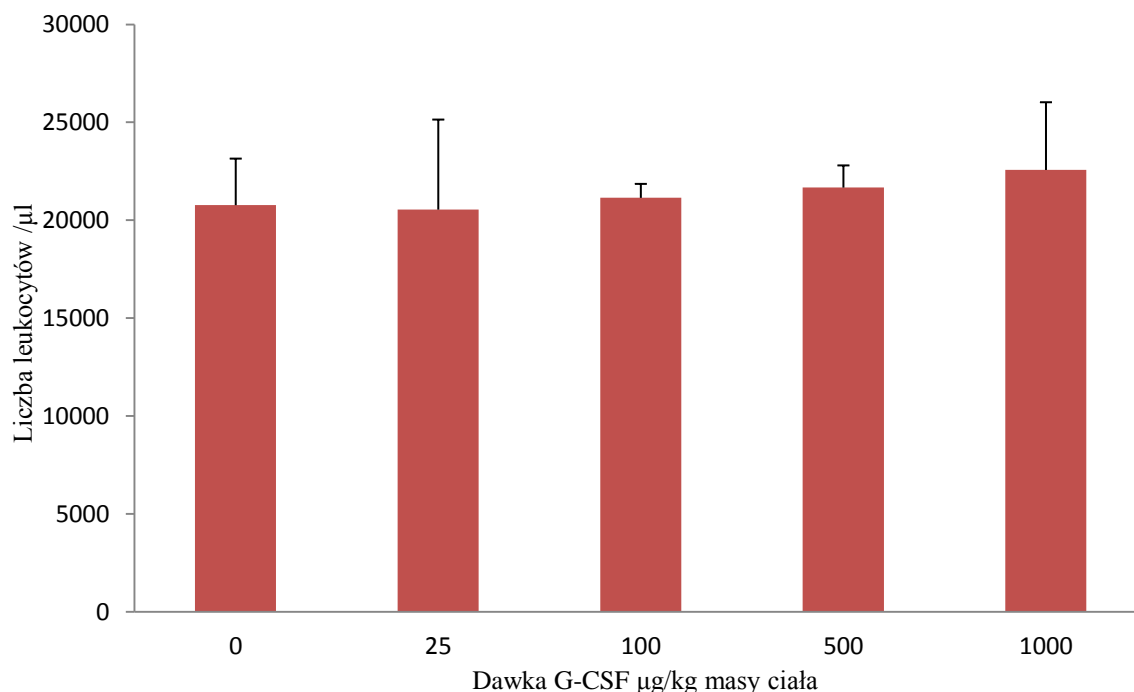
##### 4.4.1. Wpływ różnych dawek G-CSF na leukocytozę krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji za pomocą G-CSF

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu CBA leukocytoza w piątym dniu mobilizacji w grupie kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $22500 \pm 1975$  leukocytów/ $\mu$ l krwi obwodowej. Dla dawek 25 ( $24150 \pm 826$  leukocytów/ $\mu$ l), 100 ( $20625 \pm 998$  leukocytów/ $\mu$ l) i 500  $\mu$ g G-CSF/kg masy ciała ( $20850 \pm 1287$  leukocytów/ $\mu$ l), nie wykazano znaczących różnic w leukocytozie pomiędzy grupami. Dane przedstawiono na wykresie 4.15.



Wykres 4.15 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu CBA w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 1).

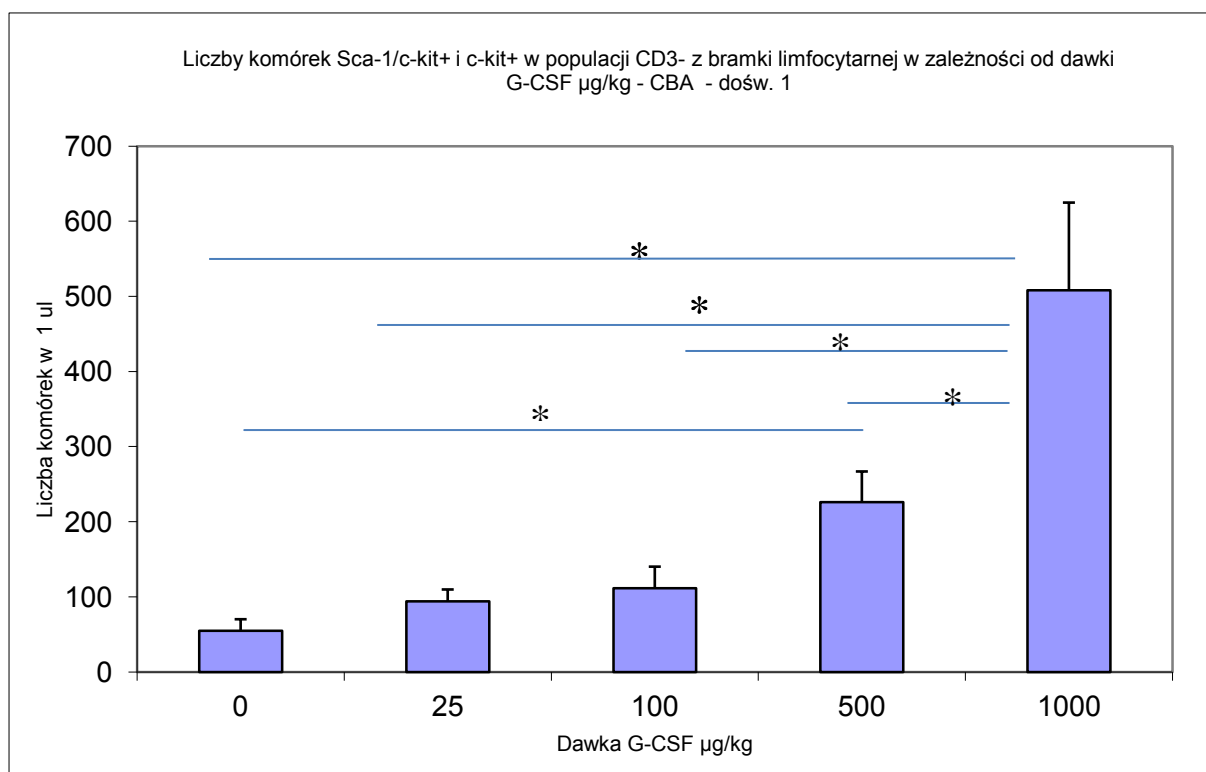
Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu nr 2. Dla grupy kontrolnej (dawka 0) leukocytoza wynosiła  $20775 \pm 1190/\mu\text{l}$ . W przypadku dawki  $25 \mu\text{g G-CSF/kg}$  masy ciała, ilość leukocytów wynosiła  $20550 \pm 2300/\mu\text{l}$  i nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej. Podobnie dla dawek 100 ( $21150 \pm 357$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ ), 500 ( $21675 \pm 566$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ ) i 1000  $\mu\text{g G-CSF/kg}$  masy ciała ( $22575 \pm 1730$  leukocytów/ $\mu\text{l}$ ) nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w leukocytozie (wykres 4.16).



Wykres 4.16 Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu CBA w zależności od wielkości dawki G-CSF (doświadczenie 2).

#### 4.4.2. Wpływ różnych dawek G-CSF na liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od wielkości dawki G - CSF

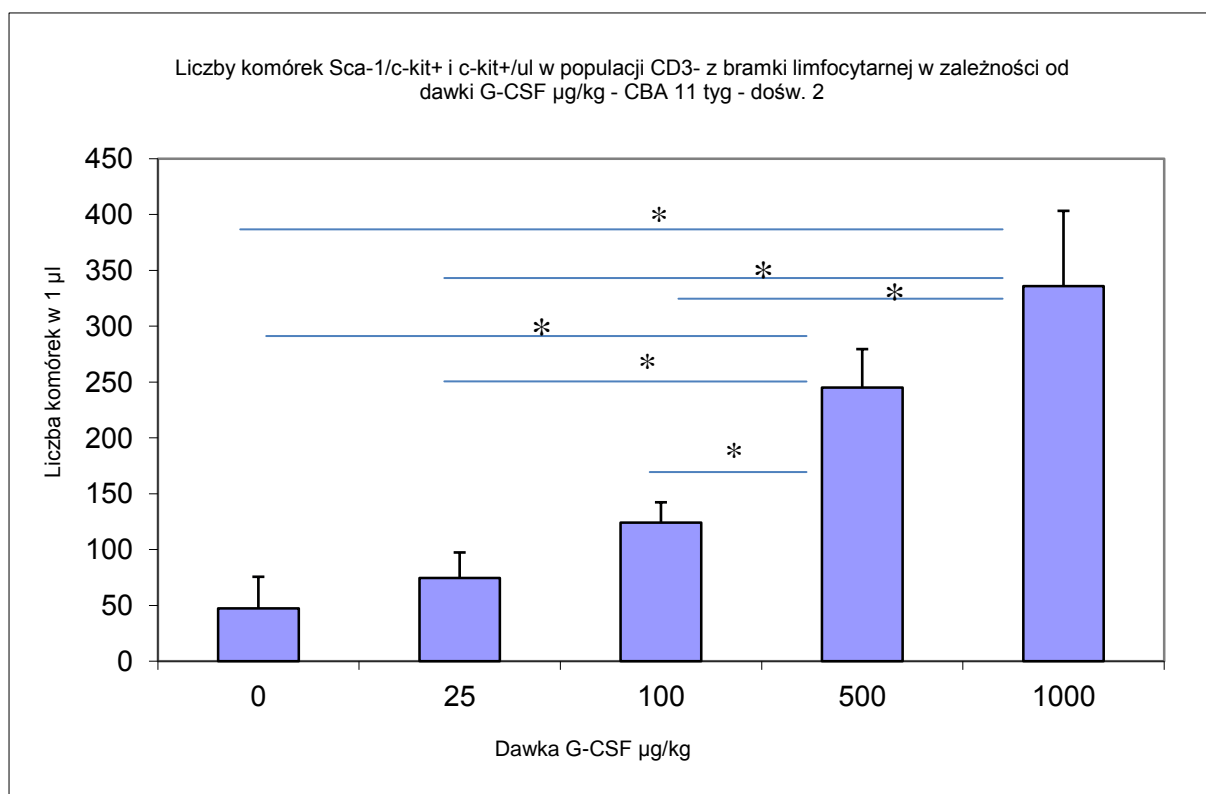
W doświadczeniu nr 1 (Wykres 4.17) liczba komórek krwiotwórczych dla grupy kontrolnej (dawka 0) wynosiła  $55 \pm 8$  komórek w  $1 \mu\text{l}$  krwi obwodowej. W przypadku dawek 25 i  $100 \mu\text{g/kg}$  G-CSF, liczba komórek nie była istotnie różna i stanowiła odpowiednio  $94 \pm 8$  komórek/ $\mu\text{l}$  i  $111 \pm 14$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Natomiast wzrost dawki do 500 i  $1000 \mu\text{g/kg}$  spowodował znaczący wzrost liczby komórek, odpowiednio:  $226 \pm 21$  komórek/ $\mu\text{l}$  i  $508 \pm 58$  komórek/ $\mu\text{l}$ . W przypadku grupy myszy mobilizowanych dawką  $1000 \mu\text{g/kg}$  obserwowano różnice istotne statystycznie w stosunku do wszystkich pozostałych grup.



Wykres 4.17 Liczba macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy CBA (doświadczenie 1, \* $p < 0,05$ )

W doświadczeniu 2 (Wykres 4.18) dla grupy kontrolnej (dawka 0) ilość macierzystych komórek krwiotwórczych wynosiła  $47 \pm 14$  komórek/ $\mu\text{l}$  krwi obwodowej. Dla dawki G-CSF  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$  odnotowano nieznaczny wzrost ilości komórek do poziomu  $74 \pm 12$  komórek/ $\mu\text{l}$ , jednak różnica nie była istotna statystycznie. W przypadku dawek 100, 500 i  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  ilość komórek krwiotwórczych wyniosła odpowiednio  $124 \pm 9$ ,  $245 \pm 17$  i  $336 \pm 34$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Statystycznie istotne różnice obserwowano między grupami: 500 a 0, 25 i  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  oraz 1000 a 0, 25 i  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ .





Wykres 4.18 Liczba macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G-CSF u myszy CBA (doświadczenie 2, \* $p < 0,05$ )

#### 4.4.3. Zdolność mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* (CFU Assay)

W doświadczeniu 1 (Tabela 4.8) w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost 7 jednostek tworzących kolonie granulocytów CFU - G. Dawka 100  $\mu\text{g}$  G-CSF/ $\mu\text{l}$  spowodowała wzrost 11 jednostek tworzących kolonie granulocytów CFU - G, 6 jednostek tworzących skupiska kolonii erytrocytów BFU - E i 2 jednostek mieszanych, łącznie 19 jednostek. Największą liczbę powstałych jednostek zanotowano przy dawce 1000  $\mu\text{g}$  C - CSF/kg masy ciała, odpowiednio 13 jednostek CFU - G i 7 BFU - E. Dane przedstawiono w Tabeli 4-8.

Dawka G-CSF μg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	7	-	-	<b>7</b>
<b>25</b>	10	-	2	<b>12</b>
<b>100</b>	11	6	2	<b>19</b>
<b>500</b>	9	8	-	<b>17</b>
<b>1000</b>	13	7	-	<b>20</b>

Tabela 4.8 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu CBA - doświadczenie 1.

W doświadczeniu 2 (Tabela 4.2) w przypadku grupy kontrolnej (dawka 0) zaobserwowano wzrost 5 jednostek tworzących kolonie granulocytów. Największą liczbę jednostek zanotowano przy dawce 1000 μg/kg masy ciała, 8 jednostek CFU - G, 6 jednostek BFU - E i 7 jednostek mieszanych, łącznie 21 jednostek. Dane przedstawiono w Tabeli 4.9.

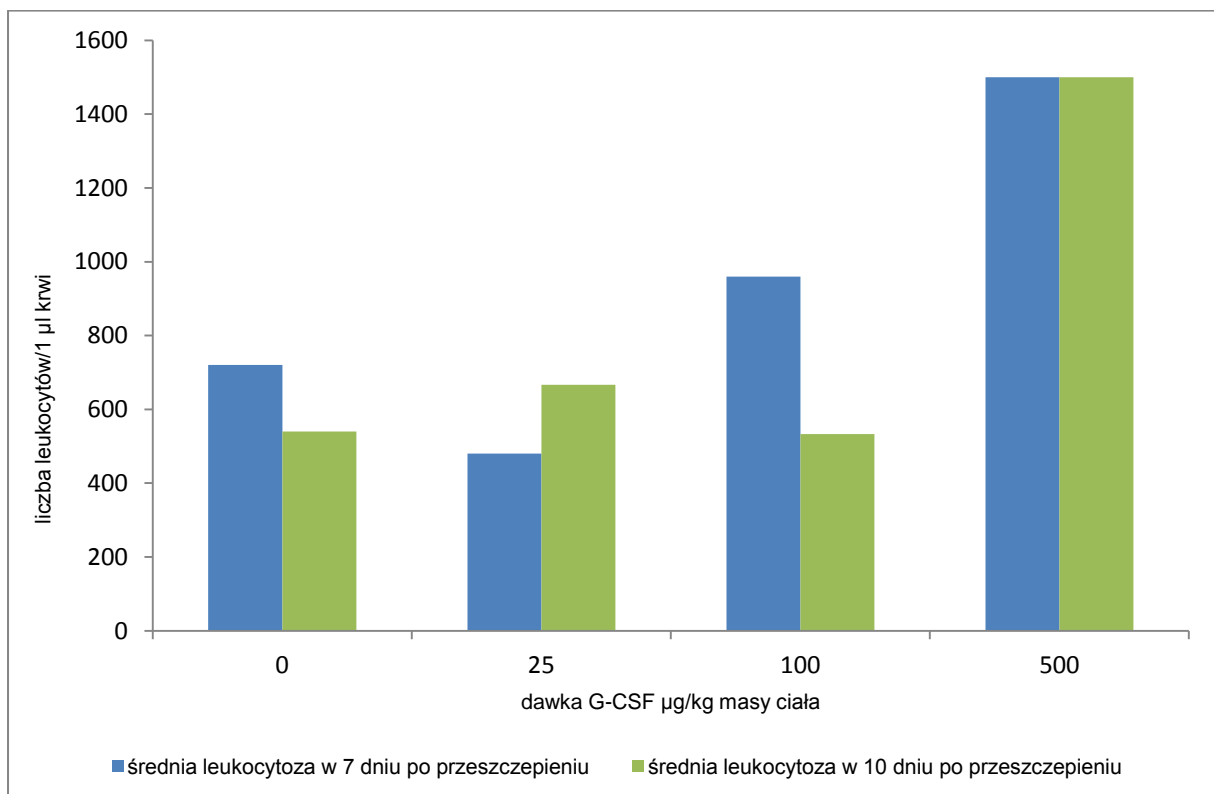
Dawka G-CSF μg/kg m.c.	CFU - G	BFU - E	Mieszane	Suma
	liczba jednostek tworzących kolonie			
<b>0</b>	5	-	-	<b>5</b>
<b>25</b>	5	1	-	<b>6</b>
<b>100</b>	6	-	2	<b>8</b>
<b>500</b>	7	3	7	<b>17</b>
<b>1000</b>	8	6	7	<b>21</b>

Tabela 4.9 Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* w zależności od wielkości dawki G-CSF u myszy szczepu C57BL/6 - doświadczenie 2.

## 4.5. ODNOWIENIE HEMATOPOEZY PRZY UŻYCIU KRWI OBWODOWEJ MOBILIZOWANEJ RÓŻNYMI DAWKAMI G-CSF W MYSIM MODELU SYNGENICZNYM

### 4.5.1 Szczep Balb/c

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu Balb/c średnia leukocytoza w 7 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych syngenicznych mobilizowanych kolejno wzrastającymi dawkami G-CSF: 0 (kontrola), 25, 100 i 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  osiągnęła wartość odpowiednio 720, 480, 960 i 1500/ $\mu\text{l}$ . W 10 dniu po przeszczepieniu wartości wynosiły odpowiednio: 540, 667, 533 i 1500/ $\mu\text{l}$ . Różnice nie były istotne statystycznie, lecz można zauważyć tendencję szybszej odnowy leukocytozy w grupie, która otrzymała komórki mobilizowane dawką 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dane przedstawiono na wykresie 4.19.



Wykres 4.19 Średnia leukocytoza w 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie 1.

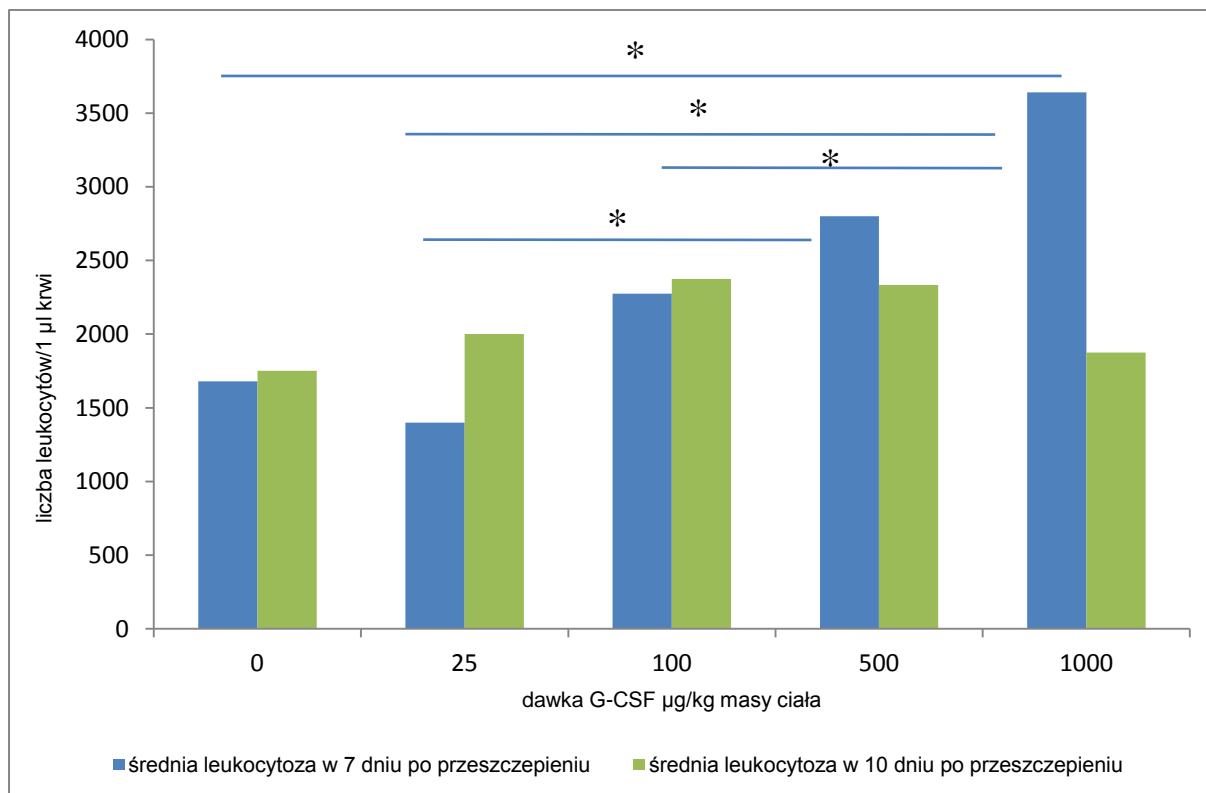
W dobie +11 oceniono ilość kolonii śledzionowych. U myszy kontrolnych (dawka 0) zaobserwowano średnio 1 kolonię śledzionowe. U myszy, u których przeszczepiono komórki mobilizowane dawką 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  obserwowano średnio

3 kolonie, w przypadku dawki mobilizacyjnej 100 i 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  średnia ilość kolonii wyniosła odpowiednio 5 i 15. Dane przedstawia tabela 4.10.

Dawka G-CSF [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Średnia liczba kolonii śledzionowych $\pm$ SD
0	1 $\pm$ 1,1
25	3 $\pm$ 1,6
100	5 $\pm$ 1,9
500	15 $\pm$ 7,9

Tabela 4.10 Średnia liczba kolonii śledzionowych w +11 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr 1.

W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu Balb/c średnia leukocytoza w 7 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych syngenicznych mobilizowanych kolejno wzrastającymi dawkami G-CSF: 0 (kontrola), 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  osiągnęła wartość odpowiednio 1680, 1400, 2275, 2800 i 3640/ $\mu\text{l}$ . W 10 dniu po przeszczepieniu wartości wynosiły odpowiednio: 1750, 2000, 2375, 2333 i 1875/ $\mu\text{l}$ . Statystycznie istotne różnice obserwowano między grupami 25, a 500 oraz między 1000, a 0, 25 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Począwszy od dawki 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  można zauważyć tendencję szybszej odnowy leukocytozy w dobie 7. Dane przedstawiono na wykresie 4.20.



Wykres 4.20 Średnia leukocytoza w 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie 2, \*  $p < 0,05$ .

W dobie +11 oceniono liczbę kolonii śledzionowych. U myszy kontrolnych (dawka 0) zaobserwowano średnio 2 kolonie śledzionowe. U myszy, u których przeszczepiono komórki mobilizowane dawką 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  obserwowano średnio 4 kolonie, w przypadku dawki mobilizacyjnej 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  średnia liczba kolonii wyniosła 9,67, w przypadku dawek 500 i 1000 obserwowano odpowiednio 24 i 22 kolonie śledzionowe Dane przedstawia tabela 4.11.

Dawka G-CSF [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	Średnia liczna kolonii śledzionowych $\pm$ SD
0	$2 \pm 1,6$
25	$4 \pm 3$
100	$9,67 \pm 2,4$
500	24
1000	$22 \pm 0$

Tabela 4.11 Średnia ilość kolonii śledzionowych w +11 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr 2.

Poniżej przedstawiono przykładowe zdjęcia kolonii śledzionowych – myszy szczepu Balb/c – dośw. 1.



Dawka 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Dawka 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$

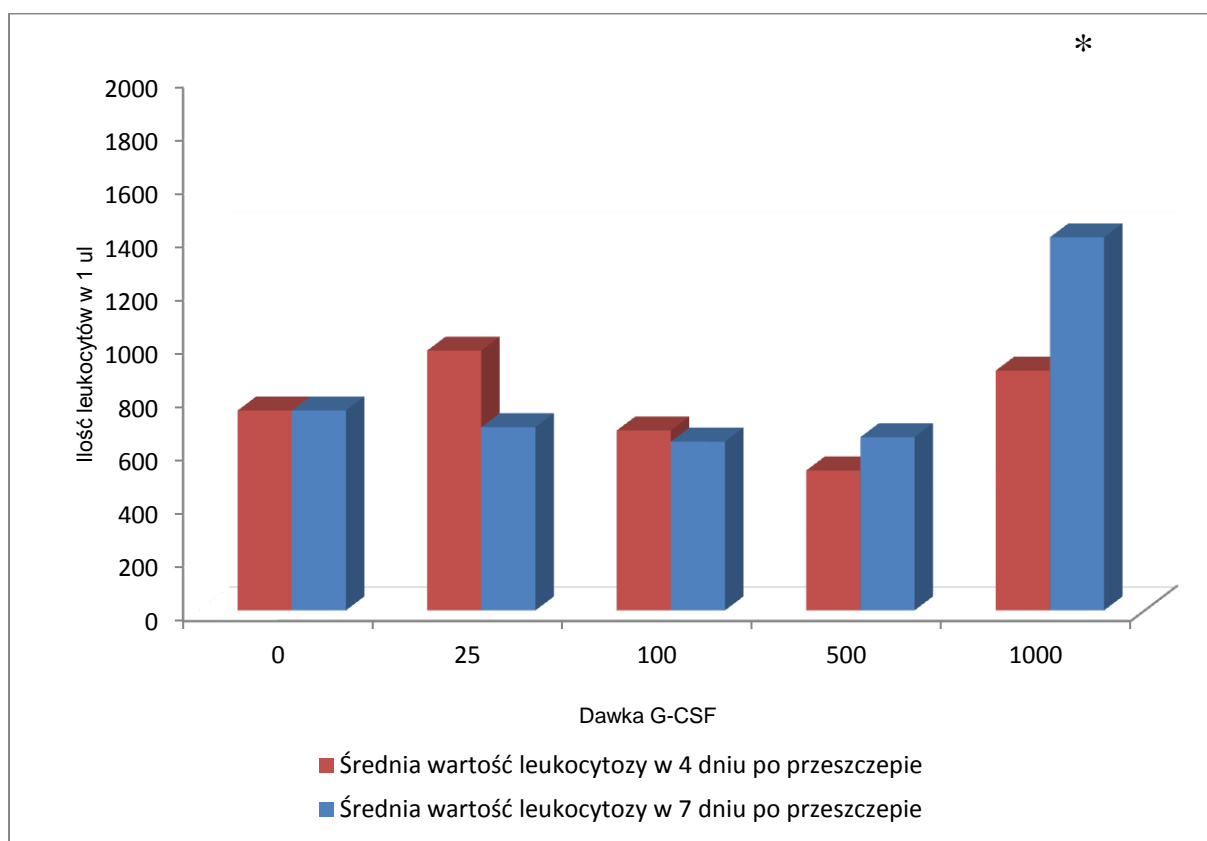
Dawka 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Dawka 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Rysunek 4.1. Kolonie śledzionowe w +11 po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr 1.

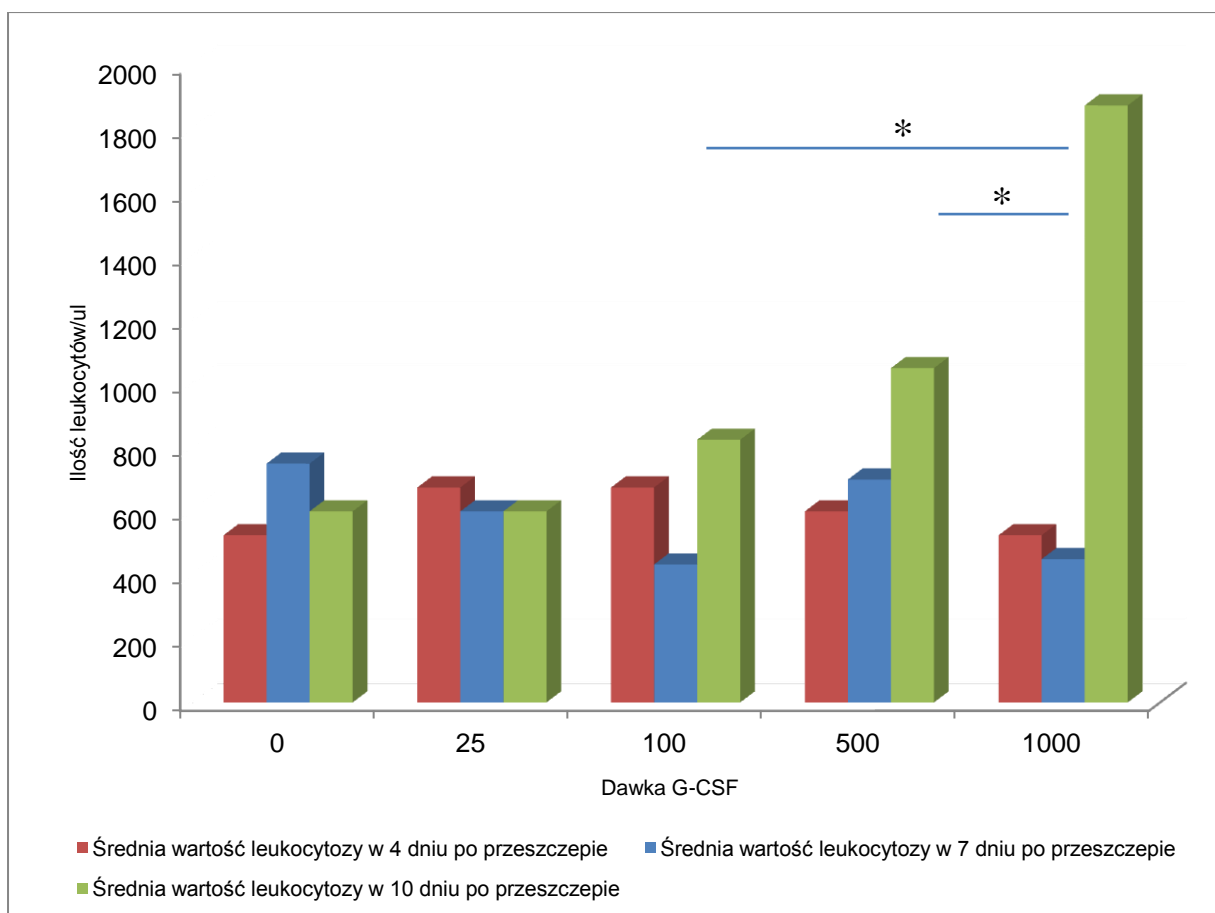
#### 4.5.2. Szczep CBA

W doświadczeniu nr 1 u myszy szczepu CBA średnia leukocytoza w 4 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych syngenicznych mobilizowanych kolejno wzrastającymi dawkami G-CSF: 0 (kontrola), 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  osiągnęła wartość odpowiednio 750, 975, 675, 525 i 900/ $\mu\text{l}$ . W 7 dniu po przeszczepieniu wartości wynosiły odpowiednio: 750, 688, 633, 650 i 1400/ $\mu\text{l}$ . Statystycznie istotne różnice obserwowano w 7 dobie między grupą 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a wszystkimi pozostałymi grupami. Dane przedstawiono na wykresie 4.21.



Wykres 4.21 Średnia leukocytoza w 4 i 7 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu CBA – doświadczenie 1, \*  $p < 0,05$ .

W doświadczeniu nr 2 u myszy szczepu CBA średnia leukocytoza w 4 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych syngenicznych mobilizowanych kolejno wzrastającymi dawkami G-CSF: 0 (kontrola), 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  osiągnęła wartość odpowiednio 525, 675, 675, 600 i 525/ $\mu\text{l}$ . W 7 dniu po przeszczepieniu wartości wynosiły odpowiednio: 750, 600, 433, 700 i 450 / $\mu\text{l}$ . W 10 dobie wartości leukocytozy wynosiły odpowiednio: 600, 600, 825, 1050 i 1875. Statystycznie istotne różnice obserwowano w 7 dobie między grupą 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a wszystkimi pozostałymi grupami. Począwszy od dawki 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  można zauważyć trend szybszej odnowy leukocytozy w dobie 10. Dane przedstawiono na wykresie 4.22.



Wykres 4.22 Średnia leukocytoza w 4, 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF u myszy szczepu CBA – doświadczenie 2, \*  $p < 0,05$ .



## **5. WYNIKI – OBSERWACJA KLINICZNA.**

### **5.1. OCENA SKUTECZNOŚCI MOBILIZACJI.**

#### **5.1.2. I cykl mobilizacji.**

W wyniku mobilizacji w pierwszym cyklu uzyskano minimalną niezbędną do przeszczepienia liczbę komórek krwiotwórczych ( $\geq 2 \cdot 10^6/\text{kg}$  masy ciała) u 70 pacjentów (85%). Optymalną liczbę komórek krwiotwórczych ( $> 3 \cdot 10^6/\text{kg}$  masy ciała) uzyskano w pierwszym cyklu mobilizacji u 50 (61%) pacjentów. W pierwszym cyklu mobilizacji nie uzyskano minimalnej liczby komórek krwiotwórczych u 12 (15%) dzieci.

W pierwszym cyklu mobilizacji pierwszego dnia separacji (78 przypadków, 95%), leukocytoza wynosiła średnio 39064/ $\mu\text{l}$  (mediana 38800), od 1200 do 86600; odsetek komórek CD34<sup>+</sup> we krwi przed rozpoczęciem separacji wynosił średnio 0,17% (mediana 0,10%), od 0,02 do 1,82%; liczba komórek CD34<sup>+</sup> we krwi wynosiła średnio 49/ $\mu\text{l}$  (mediana 28) od 10 do 370; liczba zebranych komórek CD34<sup>+</sup> wynosiła średnio 3,26 (mediana 2,15) od 0,2 – 15 x 10<sup>6</sup>/kg m.c. Objętość krwi separowanej wynosiła średnio 6200 (mediana 4700) od 1800 – 16000 ml, co stanowiło średnio 3 (mediana 3) od 2 do 4 objętości krwi krążącej.

Drugą separację pierwszej mobilizacji przeprowadzono u 55 (67%) pacjentów. W tym dniu leukocytoza wynosiła średnio 41840/ $\mu\text{l}$  (mediana 40300) od 4000 do 96700; odsetek komórek CD34<sup>+</sup> wynosił średnio 0,11% (mediana 0,06) od 0,01 do 0,64; liczba komórek CD34<sup>+</sup> we krwi wynosiła średnio 30/ $\mu\text{l}$  (mediana 19,5) od 7 do 309; liczba zebranych komórek CD34<sup>+</sup> wynosiła średnio 1,75 x 10<sup>6</sup>/kg m.c. pacjenta (mediana 1,3) od 0,3 do 5,5. Objętość krwi separowanej wynosiła średnio 5800 ml (mediana 4500) od 1700 do 12000 ml, co stanowiło średnio 3 objętości krwi krążącej (mediana 3) od 1,3 do 4,0.

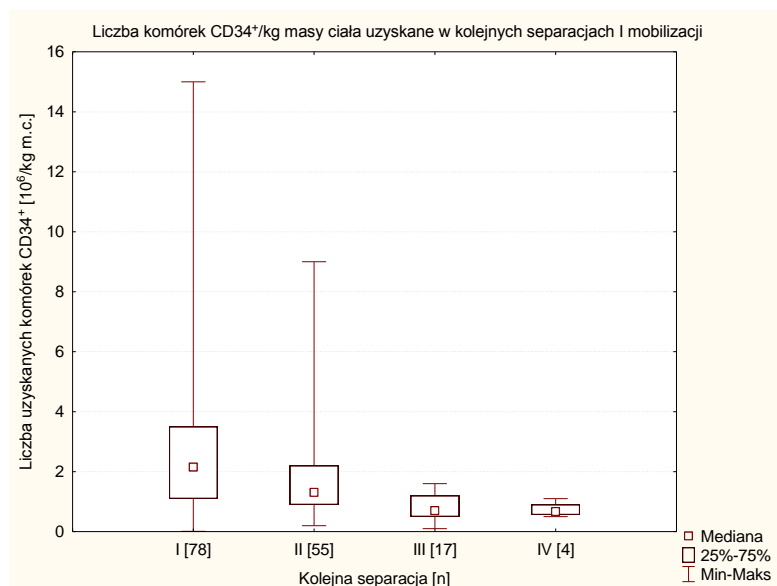
Trzy separacje w pierwszym cyklu mobilizacji przeprowadzono u 17 (21%) pacjentów. W tym dniu separacji leukocytoza wynosiła średnio 43540/ $\mu\text{l}$  (mediana 40450) od 19800 do 78900; odsetek komórek CD34<sup>+</sup> wynosił średnio 0,04% (mediana 0,04%) od 0,02 do 0,08; liczba CD34<sup>+</sup> we krwi wynosiła średnio 15,6/ $\mu\text{l}$  (mediana 15,3)

od 8 do 31. W trzecim dniu separacji liczba zebranych komórek CD34<sup>+</sup> wynosiła średnio 0,82 x 10<sup>6</sup>/kg m.c. (mediana 0,7) od 0,1 do 1,6. Objętość krwi separowanej w trzecim dniu wynosiła średnio 6500 ml (mediana 6000) 1700 – 12000 ml, co stanowiło średnio 3 objętości krwi (mediana 3), od 2 do 4 dla danego pacjenta.

Czwartą separację w pierwszym cyklu mobilizacyjnym miało 4 pacjentów. Oceniane parametry przedstawiały się następująco: leukocytoza wynosiła średnio 38100/ $\mu$ l (mediana 34200), od 22800 do 47000; odsetek komórek CD34<sup>+</sup> wynosił średnio 0,047% (mediana 0,05) od 0,03 do 0,06; liczba CD34<sup>+</sup> we krwi wynosiła średnio 20,7/ $\mu$ l (mediana 20) od 7 do 24. Objętość krwi separowanej wynosiła średnio 3500 ml (mediana 3200) od 1600 do 6000, co stanowiło średnio 2,6 (mediana 2,5) od 1,5 do 4. Liczba zebranych komórek CD34<sup>+</sup> wynosiła średnio 0,73 x 10<sup>6</sup>/kg m.c. (mediana 0,66) od 0,5 do 1,1.

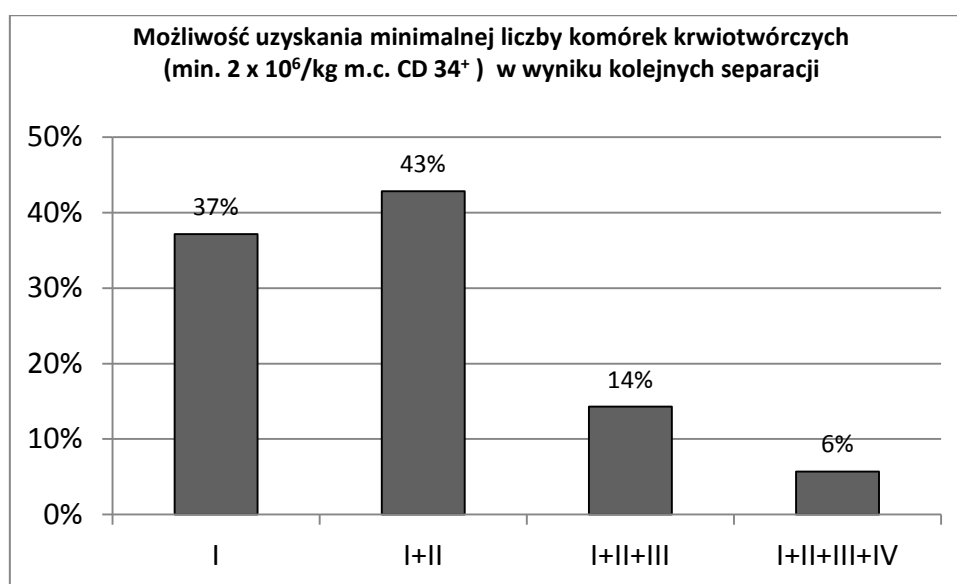
Łącznie w wyniku przeprowadzonej pierwszej mobilizacji i średnio 2 (1-4) kursów separacji uzyskano średnio 4,87 (mediana 3,7) od 0,4 do 15 x 10<sup>6</sup>/kg masy ciała komórek CD34<sup>+</sup>.

Liczbę komórek krwiotwórczych otrzymanych w wyniku poszczególnych dni separacji przedstawiono zbiorczo na wykresie. (Wykres. 5.1)



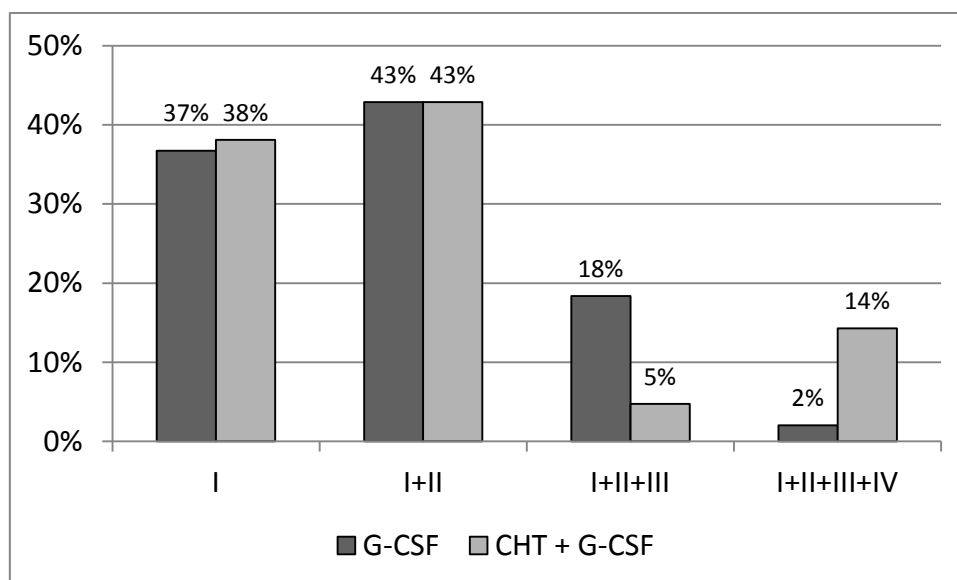
Wykres 5.1 Liczba zebranych komórek w kolejnych separacjach (wydajność leukaferazy). W nawiasach liczba obserwacji (leukaferaz) w danym dniu separacji.

W grupie pacjentów, u których uzyskano w wyniku I cyklu mobilizacji minimalną wystarczającą ilość komórek krwiotwórczych, u 26 pacjentów (37%) wystarczającą liczbę CD34<sup>+</sup> zebrano w I separacji, u 30 dzieci (43%) minimalną liczbę komórek krwiotwórczych uzyskano łącznie w 2 separacjach, dalszych 10 pacjentów (14%) uzyskało minimalną liczbę w 3 kolejnych separacjach, u 4 (6%) konieczne były 4 separacje. Dane przedstawiono na wykresie (wykres 5.2)



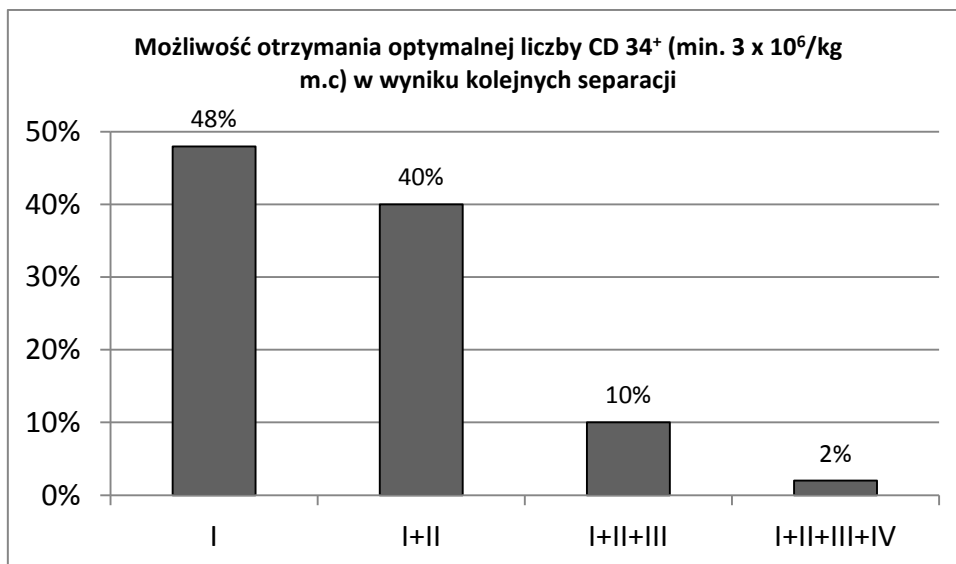
Wykres 5.2 Możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji.

W tej grupie dzieci rozkład ilości separacji koniecznych do uzyskania minimalnej liczby komórek krwiotwórczych w zależności od rodzaju mobilizacji (G-CSF vs G-CSF w skojarzeniu z chemioterapią) przedstawiono na wykresie (wykres 5.3)



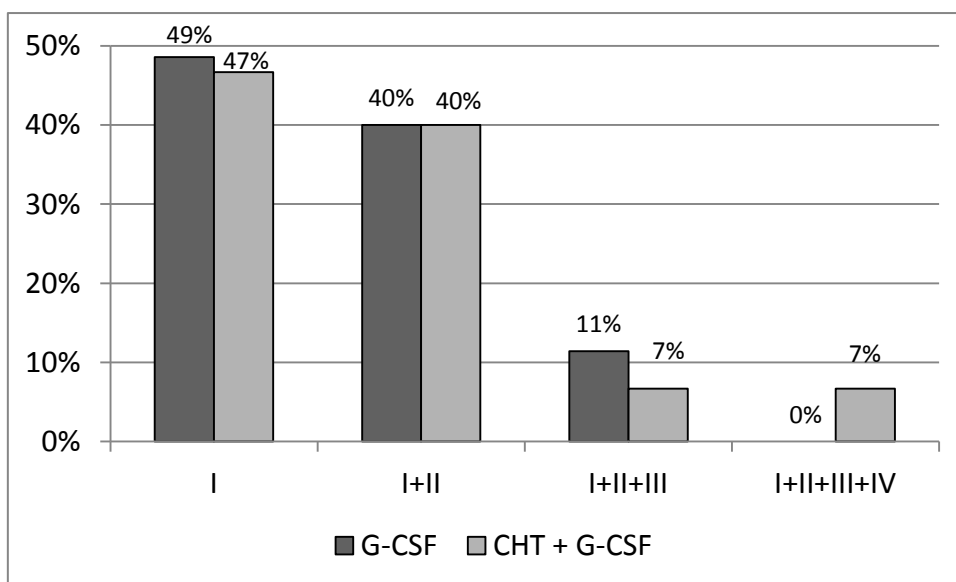
Wykres 5.3 Możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji w zależności od rodzaju mobilizacji. G-CSF – mobilizacja za pomocą wyłącznie G-CSF, G-CSF + CHT - mobilizacja za pomocą G-CSF w skojarzeniu z chemioterapią.

W grupie pacjentów, u których w wyniku I cyklu mobilizacji uzyskano optymalną ilość komórek krwiotwórczych ( $\geq 3 \times 10^6/\text{kg m.c.}$ ) – 50 pacjentów (61% wszystkich mobilizowanych w I cyklu dzieci) u 24 pacjentów (48%) otrzymano wystarczającą liczbę  $\text{CD34}^+$  w I separacji, u 20 dzieci (40%) optymalną liczbę komórek krwiotwórczych uzyskano łącznie w 2 separacjach, 5 dzieci (10%) uzyskało optymalną liczbę  $\text{CD34}^+$  w 3 kolejnych separacjach, u 1 pacjenta (2%) do uzyskania optymalnej mobilizacji przeprowadzono 4 separacje. Dane przedstawiono na wykresie (wykres 5.4)



Wykres 5.4 Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji. Wartości procentowe odnoszą się do całkowitej liczby optymalnych mobilizacji.

W tej grupie dzieci rozkład ilości separacji koniecznych do uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w zależności od rodzaju mobilizacji (G-CSF vs G-CSF w skojarzeniu z chemioterapią) przedstawiono na wykresie (wykres 5.5)



Wykres 5.5 Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji w zależności od rodzaju mobilizacji. G-CSF – mobilizacja za pomocą wyłącznie G-CSF, G-CSF + CHT - mobilizacja za pomocą G-CSF w skojarzeniu z chemioterapią.

### **5.1.3. II cykl mobilizacji.**

W pierwszym cyklu mobilizacji nie uzyskano minimalnej liczby komórek krwiotwórczych u 12 (15%) dzieci. Z tego u 4 pacjentów (5%) pierwszy cykl mobilizacji był całkowicie nieskuteczny (liczba CD34<sup>+</sup> oznaczana we krwi przed procedurą nie wzrosła  $\geq 10/ul$ ) i w tym cyklu mobilizacji nie wykonywano u nich separacji komórek krwiotwórczych. Dwoje (3%) dzieci, po całkowicie nieskutecznej mobilizacji, skierowano do pobrania komórek CD34<sup>+</sup> ze szpiku (w obu przypadkach uzyskano wystarczającą do przeszczepienia liczbę komórek krwiotwórczych). U 7 (9%) pacjentów, (6 dziewczynek i 1 chłopca w wieku śr 97, mediana 133, od 28 do 154 miesięcy) powtórzono cykl mobilizacji po min 4 tygodniach odstępu od poprzedniego. U trzech chorych (4%) nastąpiła progresja choroby i odstąpiono od próby zebrania komórek krwiotwórczych zmieniając charakter dalszego postępowania terapeutycznego.

## **5.2 OCENA CZYNNIKÓW WPŁYWAJĄCYCH NA SKUTECZNOŚĆ MOBILIZACJI – ANALIZA JEDNOCZYNNIKOWA**

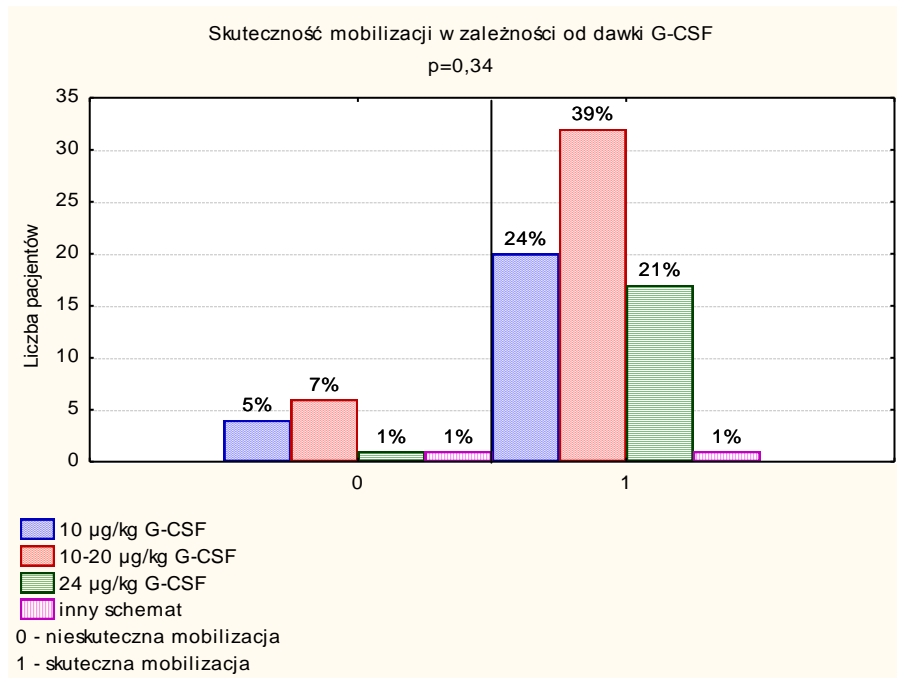
W dalszych analizach uwzględniono skuteczność wyłącznie pierwszego cyklu mobilizacji.

Przeprowadzono analizę wpływu poszczególnych czynników na skuteczność pierwszego cyklu mobilizacji. Oceniano wpływ na uzyskanie minimalnej ( $\geq 2 \cdot 10^6/kg$  masy ciała) oraz optymalnej ( $\geq 3 \cdot 10^6/kg$  masy ciała) liczby komórek CD34<sup>+</sup>.

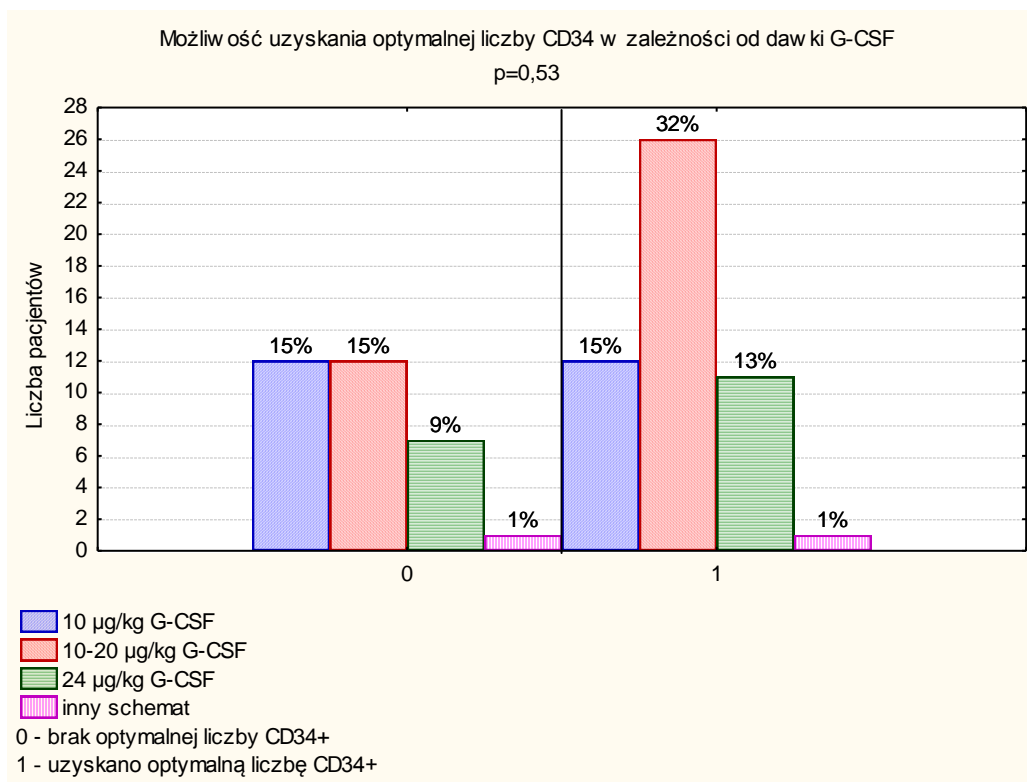
### **5.2.1. Wpływ dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji.**

W badanej grupie pacjentów oceniono wpływ dawki na skuteczność mobilizacji. Pacjenci zostali podzieleni na grupy według dawki G-CSF, która była stosowana do mobilizacji. W tej analizie wyróżniono 4 grupy: A. pacjenci otrzymujący dawkę 10  $\mu g/kg$ , C. pacjenci mobilizowani dawką 24  $\mu g/kg$ , B. dzieci które otrzymały dawkę pośrednią (między 10, a 20  $\mu g/kg$ , w większości 17  $\mu g/kg$ , a ewentualne różnice wynikały z optymalizacji podaży do masy ciała pacjenta) oraz D. inny schemat – u 2 pacjentów podczas mobilizacji podwyższono dawkę z 15 do 24  $\mu g/kg$ . Nie

stwierdzono istotnego statystycznie wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji, zarówno na uzyskanie minimalnej ( $p=0,34$ ), jak i optymalnej ( $p=0,53$ ) liczby komórek CD34<sup>+</sup>. Rozkład procentowy pacjentów skutecznie i nieskutecznie mobilizowanych poszczególnymi dawkami G-CSF przedstawiono na histogramach (wykresy 5.8 i 5.9).



Wykres 5.8 Skuteczność mobilizacji w zależności od dawki G-CSF. 0 – mobilizacja nieskuteczna, 1 – mobilizacja skuteczna. Histogram przedstawia rozkład pacjentów mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF.

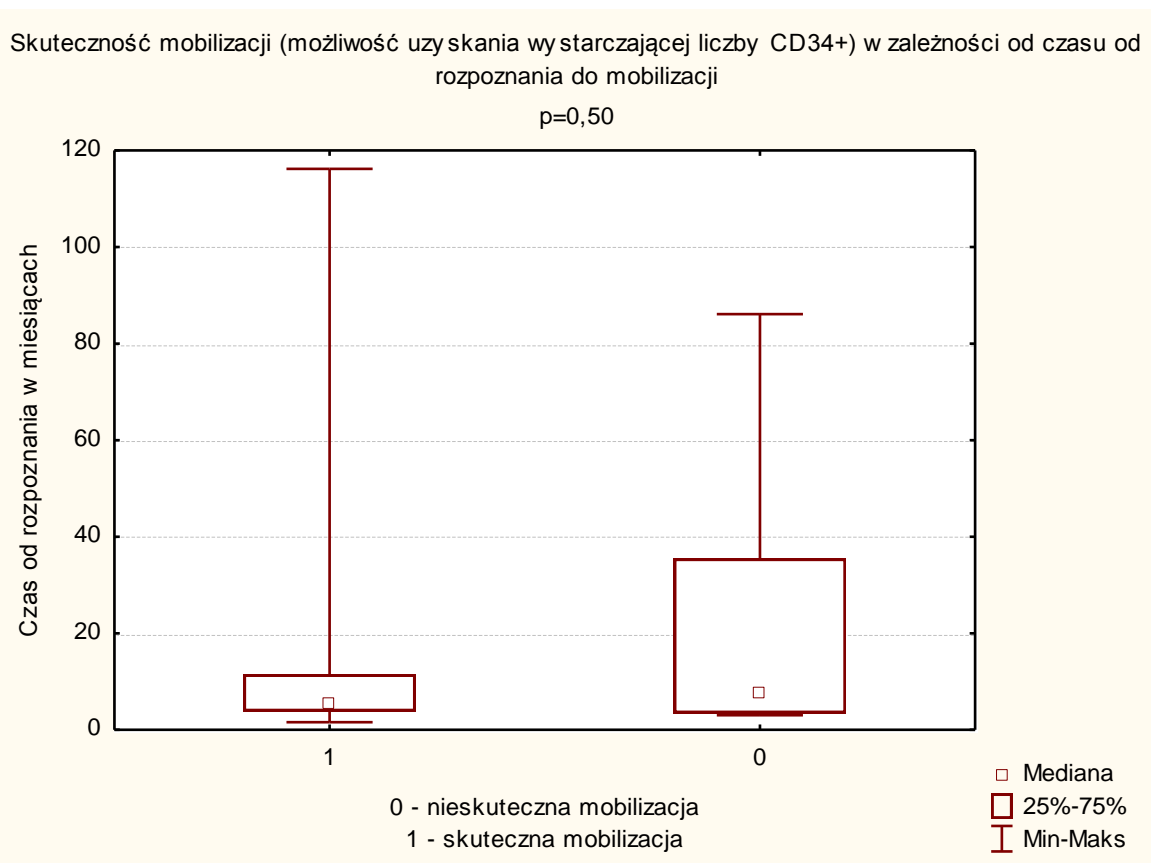


Wykres 5.9 Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek CD34+ w wyniku mobilizacji w zależności od dawki G-CSF. 0 – brak optymalnej liczby CD34+, 1 – uzyskano optymalną liczbę CD34+. Histogram przedstawia rozkład pacjentów mobilizowanych różnymi dawkami G-CSF.

### 5.2.2. Wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji na skuteczność mobilizacji.

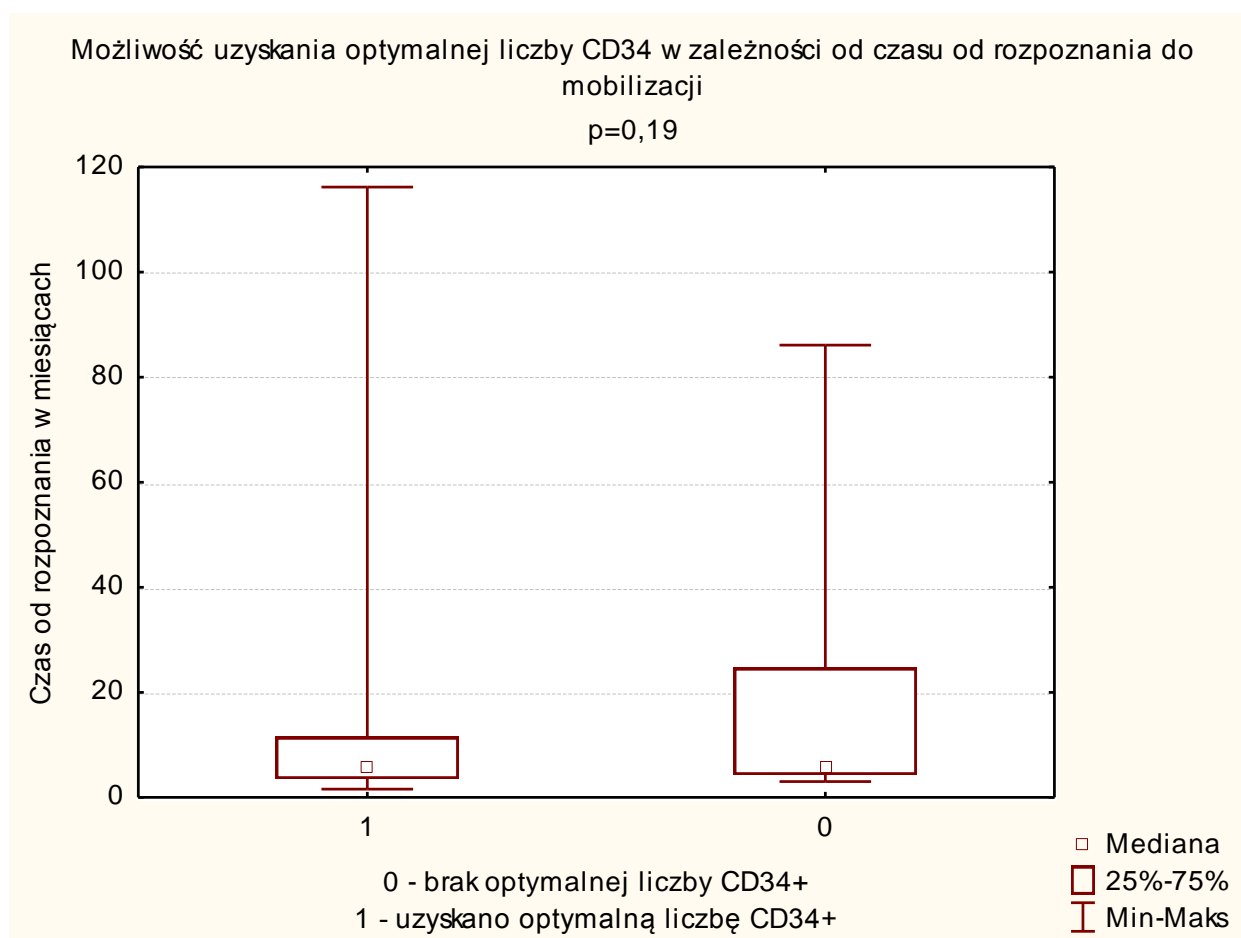
W badanej grupie pacjentów oceniono wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji na jej skuteczność. W grupie dzieci, u których mobilizacja była skuteczna średni czas od rozpoznania do mobilizacji wyniósł 12 miesięcy, z medianą 6 miesięcy (zakres od 2 do 116 miesięcy), w grupie dzieci nieskutecznie mobilizowanych średni czas od rozpoznania do mobilizacji wyniósł 22 miesiące, z medianą 8 miesięcy (zakres od 3 do 86 miesięcy). Różnice te jednak nie były istotne statystycznie. Powyższe dane przedstawia wykres (wykres 5.10).





Wykres 5.10 Skuteczność mobilizacji w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji. 0 - mobilizacja nieskuteczna, 1 - mobilizacja skuteczna. Czas wyrażony jest w miesiącach.

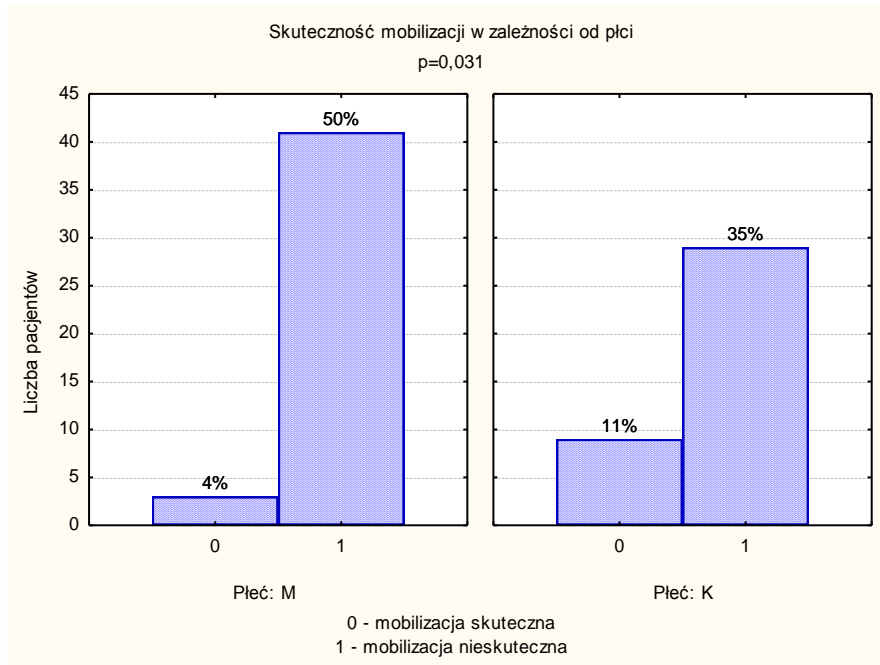
U pacjentów, u których w wyniku I cyklu mobilizacji uzyskano optymalną liczbę komórek krwiotwórczych, średni czas od rozpoznania do mobilizacji wyniósł 12 miesięcy, z medianą 6 miesięcy (zakres od 2 do 116 miesięcy), w grupie dzieci, które nie uzyskały optymalnej liczby komórek krwiotwórczych średni czas od rozpoznania do mobilizacji wyniósł 15 miesiące, z medianą 8 miesięcy (zakres od 3 do 86 miesięcy). Różnice te również nie były istotne statystycznie. Powyższe dane przedstawia wykres (wykres 5.11).



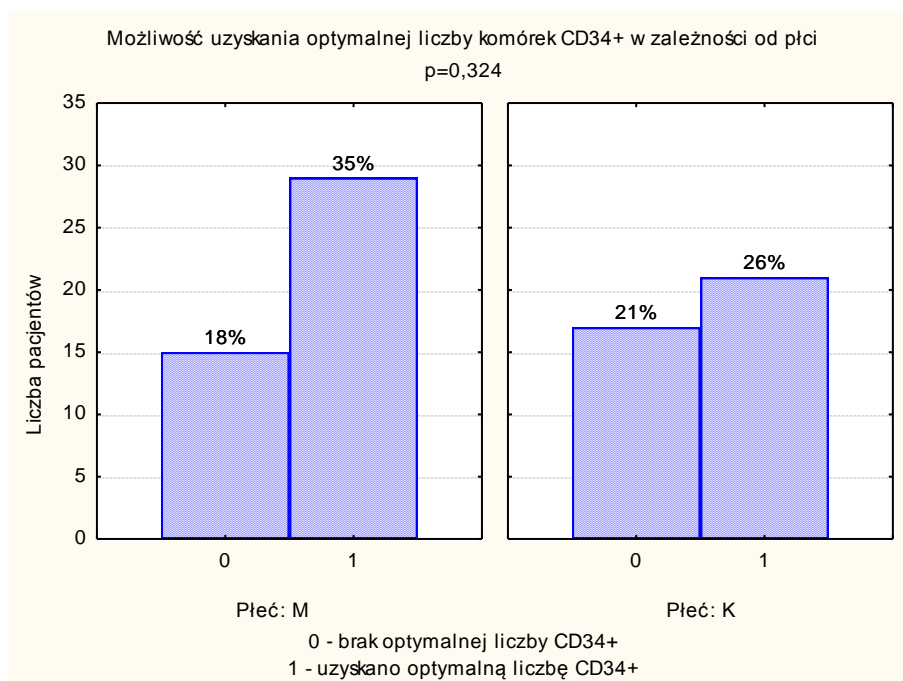
Wykres 5.11 Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek CD34+ w wyniku mobilizacji w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji. 0 – brak optymalnej liczby CD34+, 1 – uzyskano optymalną liczbę CD34+. Czas przedstawiono w miesiącach.

### 5.2.3. Wpływ płci na skuteczność mobilizacji

W badanej grupie pacjentów stwierdzono istotny statystycznie wpływ płci na skuteczność mobilizacji ( $p=0,031$ ). Wyższą skuteczność obserwowano w grupie chłopców. Natomiast możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych nie różniła się statystycznie w zależności od płci ( $p=0,324$ ). Rozkład procentowy pacjentów skutecznie i nieskutecznie mobilizowanych, w zależności od płci przedstawiono na histogramach – wykresy 5.12 i 5.13.



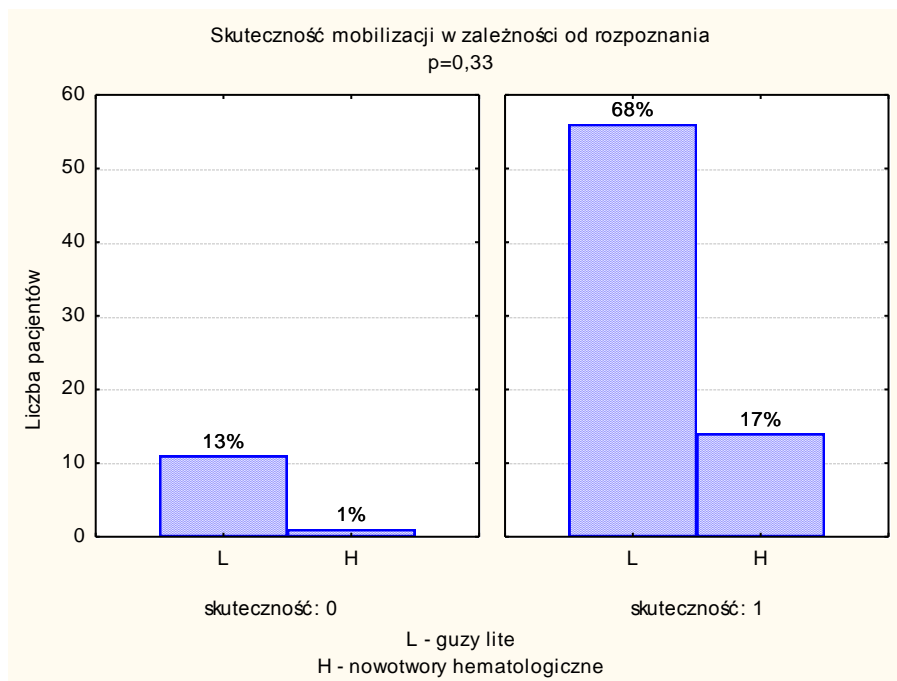
Wykres 5.12 Skuteczność mobilizacji w zależności od płci. 0 – mobilizacja nieskuteczna, 1 – mobilizacja skuteczna.



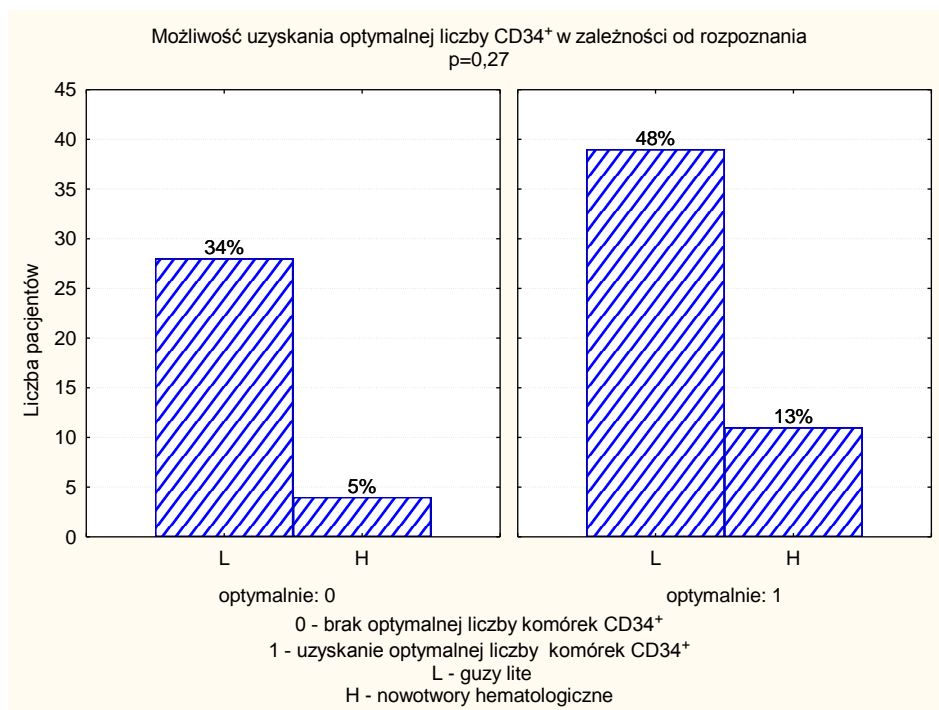
Wykres 5.13 Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od płci.

#### 5.2.4. Wpływ rodzaju choroby podstawowej na skuteczność mobilizacji

W badanej grupie pacjentów przeanalizowano wpływ choroby podstawowej na skuteczność mobilizacji oraz możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych. Choroby podzielono na 2 grupy: guzy lite (zwojak współczulny zarodkowy, mięsak Ewinga, guzy mózgu i inne) oraz nowotwory hematologiczne (białaczki, chłoniaki nieziarnicze i choroba Hodgkina). Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu rozpoznania na skuteczność mobilizacji. Rozkład pacjentów w grupach skutecznie i nieskutecznie mobilizowanych ze względu na rodzaj choroby podstawowej przedstawiono na wykresach 5.14 i 5.15.



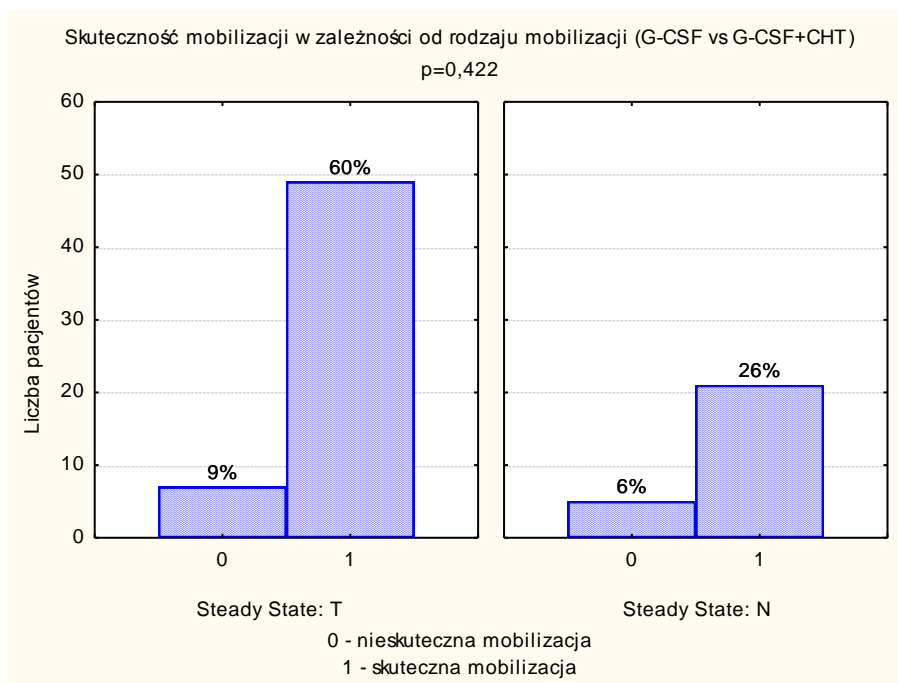
Wykres 5.14 Skuteczność mobilizacji w zależności rodzaju rozpoznania. 0 – mobilizacja nieskuteczna, 1 – mobilizacja skuteczna.



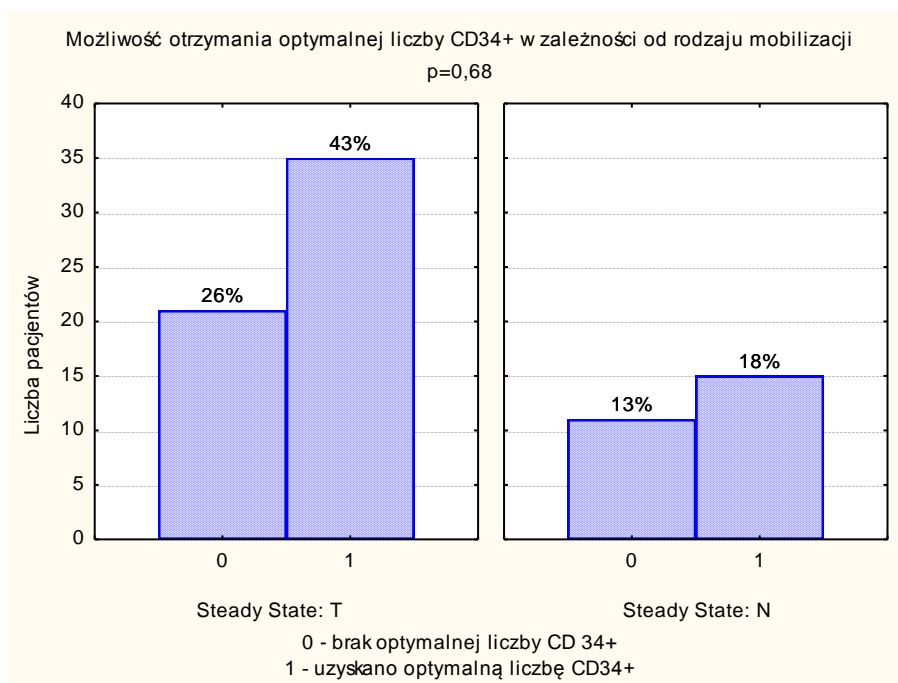
Wykres 5.15 Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od rodzaju rozpoznania.

### 5.2.5. Wpływ rodzaju mobilizacji na jej skuteczność

W badanej grupie pacjentów nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu rodzaju mobilizacji jej na skuteczność, zarówno na uzyskanie minimalnej ( $p=0,422$ ), jak i optymalnej ( $p=0,68$ ) liczby komórek CD34<sup>+</sup>. Rozkład procentowy pacjentów skutecznie i nieskutecznie mobilizowanych w zależności od rodzaju mobilizacji przedstawiono na histogramach (wykres 5.16 i 5.17).



Wykres 5.16 Skuteczność mobilizacji w zależności od rodzaju mobilizacji. T – mobilizacja wyłącznie G-CSF, N – mobilizacja skojarzona G-CSF + chemioterapia.



Wykres 5.17 Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od rodzaju mobilizacji. T – mobilizacja wyłącznie G-CSF, N – mobilizacja skojarzona G-CSF + chemioterapia.

### 5.3. ANALIZA WIELOCZYNNIKOWA

O skuteczności mobilizacji może decydować wiele czynników, których wzajemne powiązania i współzależności powodują, iż niemożliwe jest określenie pojedynczych zmiennych, jak np. dawka G-CSF, wpływających istotnie na skuteczność mobilizacji. Dlatego podjęto próbę oceny równoczesnego wpływu wielu czynników na skuteczność mobilizacji w badanej populacji.

Zastosowano uogólnioną regresję logistyczną. Celem tej analizy było znalezienie czynników wpływających na skuteczność mobilizacji i wyodrębnienie tych z nich, których wpływ jest istotny statystycznie, a w dalszym kroku stworzenie modelu oceny prawdopodobieństwa skutecznej mobilizacji.

Do oceny skuteczności mobilizacji przyjęto trójstopniową skalę skuteczności, w której przyporządkowano kolejno stopnie:

- 1 – uzyskanie minimalnej liczby komórek CD34<sup>+</sup> ( $\geq 2 \cdot 10^6$ /kg masy ciała),
- 2 – uzyskanie optymalnej ( $\geq 3 \cdot 10^6$ /kg masy ciała) liczby komórek CD34<sup>+</sup> w wyniku dwóch lub więcej kolejnych separacji,
- 3 – uzyskanie  $\geq 3 \cdot 10^6$ /kg masy ciała liczby komórek CD34<sup>+</sup> w trakcie jednej separacji.

Czynniki brane pod uwagę czynniki potencjalnie mogące mieć wpływ na skuteczność mobilizacji:

- czas od rozpoznania do mobilizacji (zmienna ciągła)
- rodzaj mobilizacji (wyłącznie G-CSF vs G-CSF + chemioterapia)
- dawka G-CSF (10  $\mu$ g/kg; 10-20  $\mu$ g/kg i >20  $\mu$ g/kg)
- kombinacja dawki w powiązaniu z rodzajem mobilizacji
- grupa rozpoznań (H – hematologiczne, NB – zwojak zarodkowy współczulny, SE – mięsak Ewinga, BT – guzy mózgu, I – inne)
- radioterapia przed mobilizacją
- płeć
- wiek ( $\leq 8$  lat vs >8 lat)

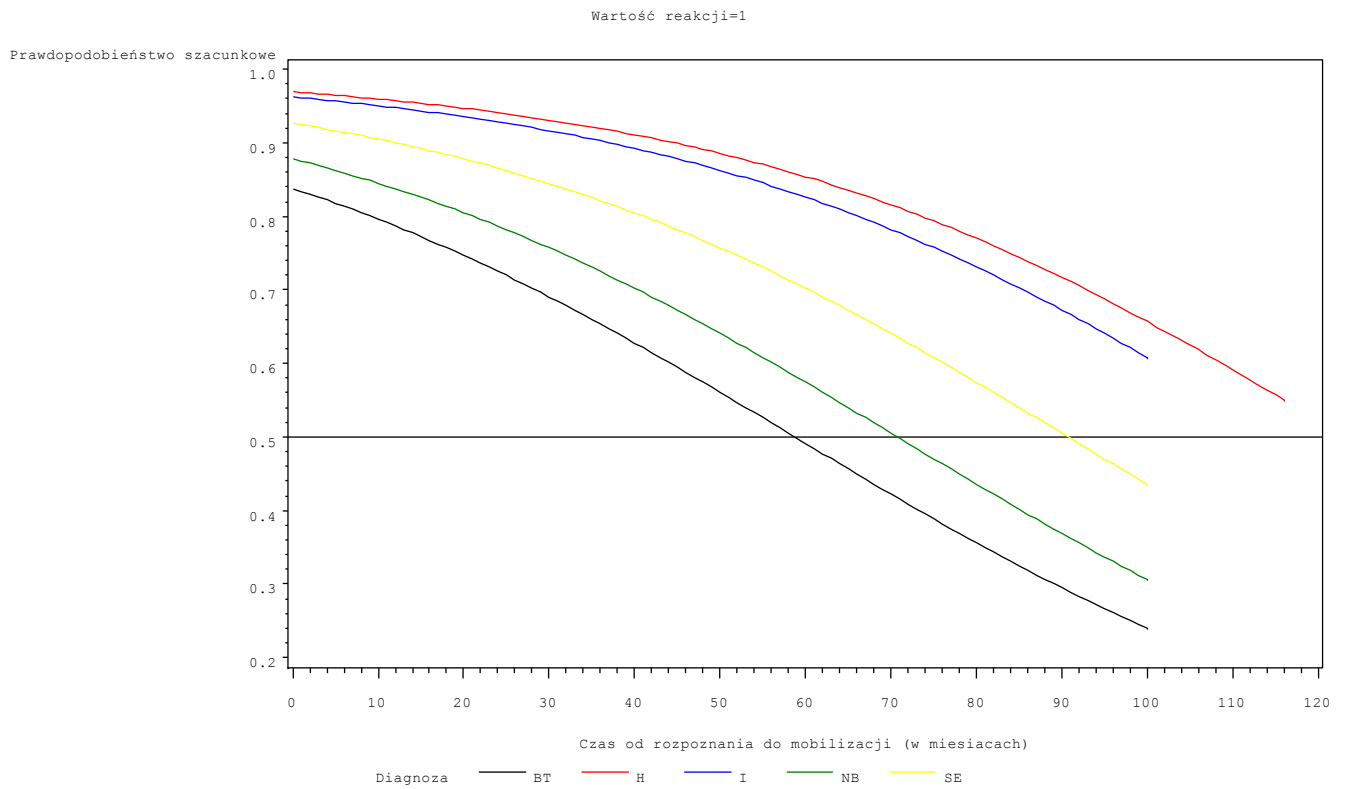
Podczas modelowania na początku uwzględniono wszystkie w/w czynniki (Model 1 w tabeli 5.1.).

prawdopodobieństwa testowe	czynnik							
model	czas od rozp	steady state	dawka G-CSF	dawka*czy_ss	dgn	rt	płeć	wiek
model1	0,0448	0,6554	0,6592	0,0475	0,0905	0,2628	0,0062	0,2873
model2	0,0939	0,6687	0,4926	0,0660	0,0851		0,0110	0,3148
model3	0,0320	0,6126	0,4146	0,0937	0,1014		0,0168	

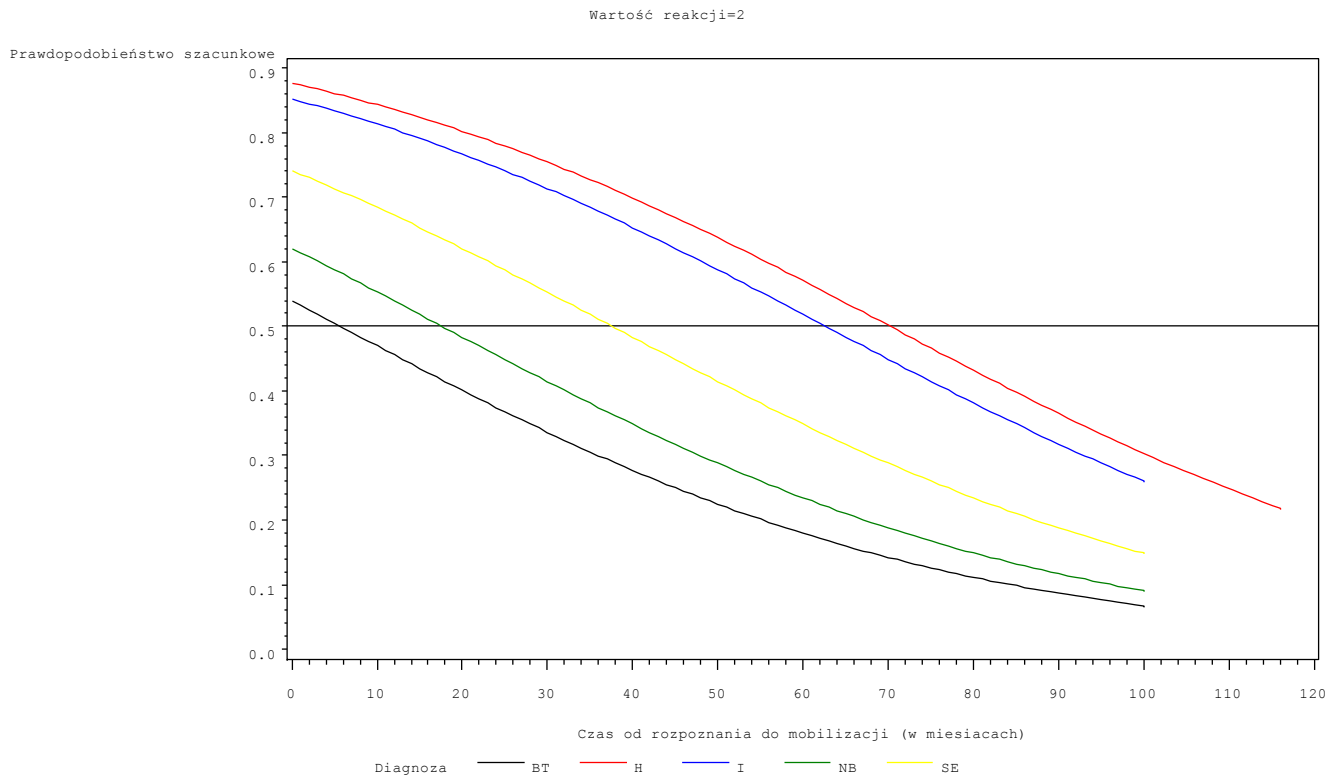
Tabela 5.1 Modele prawdopodobieństwa w modelowaniu 1. Na czerwono zaznaczono czynniki istotne statystycznie. Czas od rozp – czas od rozpoznania do mobilizacji, steady state – mobilizacja wyłącznie G-CSF, dawka\*czy\_ss – kombinacja dawki w powiązaniu z rodzajem mobilizacji, dgn – rodzaj choroby podstawowej, rt – radioterapia przed mobilizacją.

W dalszej analizie pozostawiono czynniki istotne w analizie wstępnej oraz czynniki, których ocena znaczenia była celem pracy. Kolejno eliminowano czynniki nie istotne statystycznie. Model 3 miał na celu ocenę czy dawka G-CSF jest istotna, przy uwzględnieniu pozostałych czynników istotnych statystycznie. W modelu tym dawka okazała się nie istotna statystycznie. Dlatego w kolejnych modelach nie brano jej pod uwagę. W modelu 3 istotny był czas od rozpoznania do przeszczepienia i płeć, natomiast rozpoznanie nie było istotne, ale dała się zaobserwować różnica (tendencja do lepszej mobilizacji w chorobach hematologicznych, w porównaniu do pacjentów z guzami litymi). Dlatego w kolejnym modelowaniu (nr 2) uproszczono kategorię rozpoznania. Wyniki po modelowaniu nr 1 przedstawiono graficznie na wykresach 5.18 – 5.20 jako prawdopodobieństwo otrzymania żądanej liczby komórek krwiotwórczych w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania.

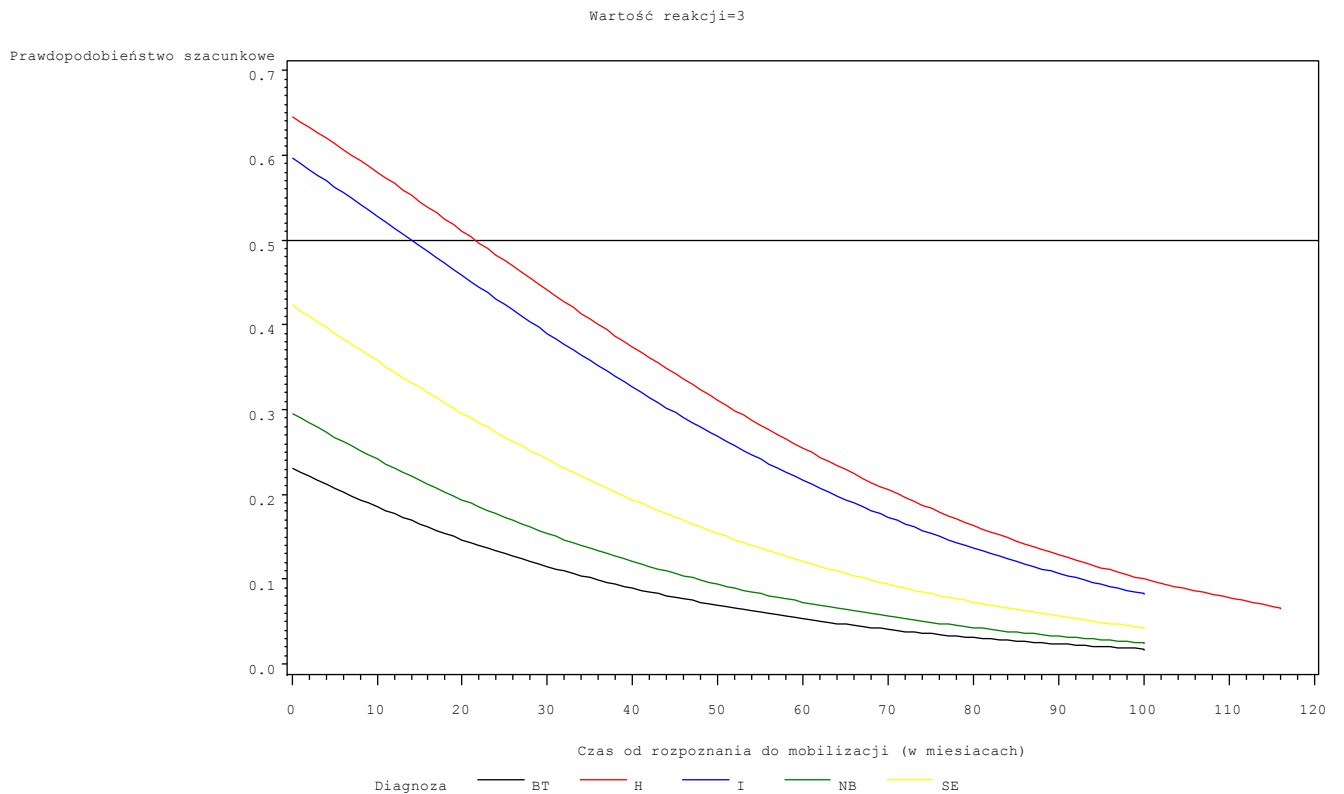




Wykres 5.18 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $2 \cdot 10^6/\text{kg}$  m.c. komórek krwiotwórczych (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania. BT – guzy mózgu, H – nowotwory hematologiczne, NB – zwojak współczulny zarodkowy, SE – mięsak Ewinga, I – inne.



Wykres 5.19 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6/\text{kg}$  m.c. komórek krwiotwórczych (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznań. BT – guzy mózgu, H – nowotwory hematologiczne, NB – zwojak współczulny zarodkowy, SE – mięsak Ewinga, I – inne.



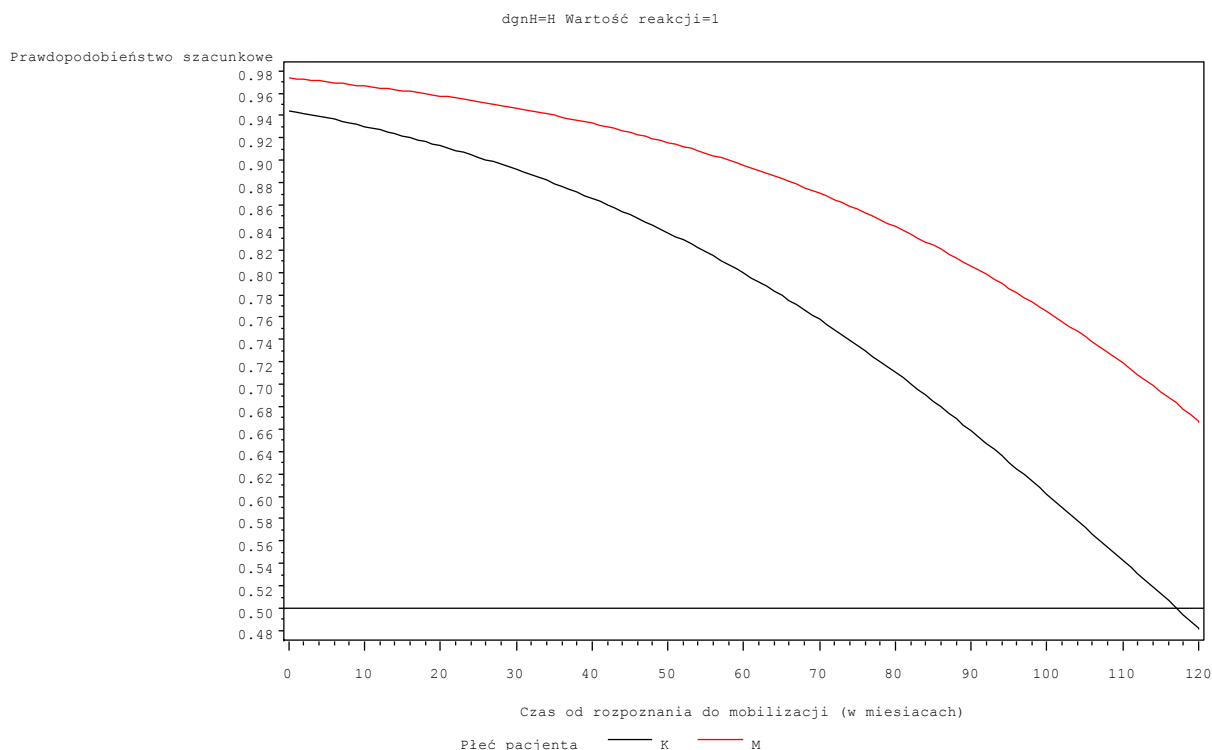
Wykres 5.20 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6/\text{kg}$  m.c. komórek krwiotwórczych w trakcie jednej separacji (stopień 3. w skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania. BT – guzy mózgu, H – nowotwory hematologiczne, NB – zwojak współczulny zarodkowy, SE – mięsak Ewinga, I – inne.

W związku z powyższymi wynikami przeprowadzono ponowną analizę (modelowanie nr 2 – tabela 5.2) wprowadzając podział na H – choroby hematologiczne i ST – guzy lite, a dawkę G-CSF traktowano jako zmienną ciągłą. Ponownie nieistotna okazała się dawka, jednak w tym przypadku obserwowano wyraźnie niższe p ( $p=0,20$ ). W modelu uwzględniającym jedynie czas od rozpoznania, rozpoznanie i płeć istotne statystycznie okazał się czas od rozpoznania i rodzaj diagnozy. W modelu tym także zaznaczył się wpływ płci w postaci trendu ( $p=0,08$ ).

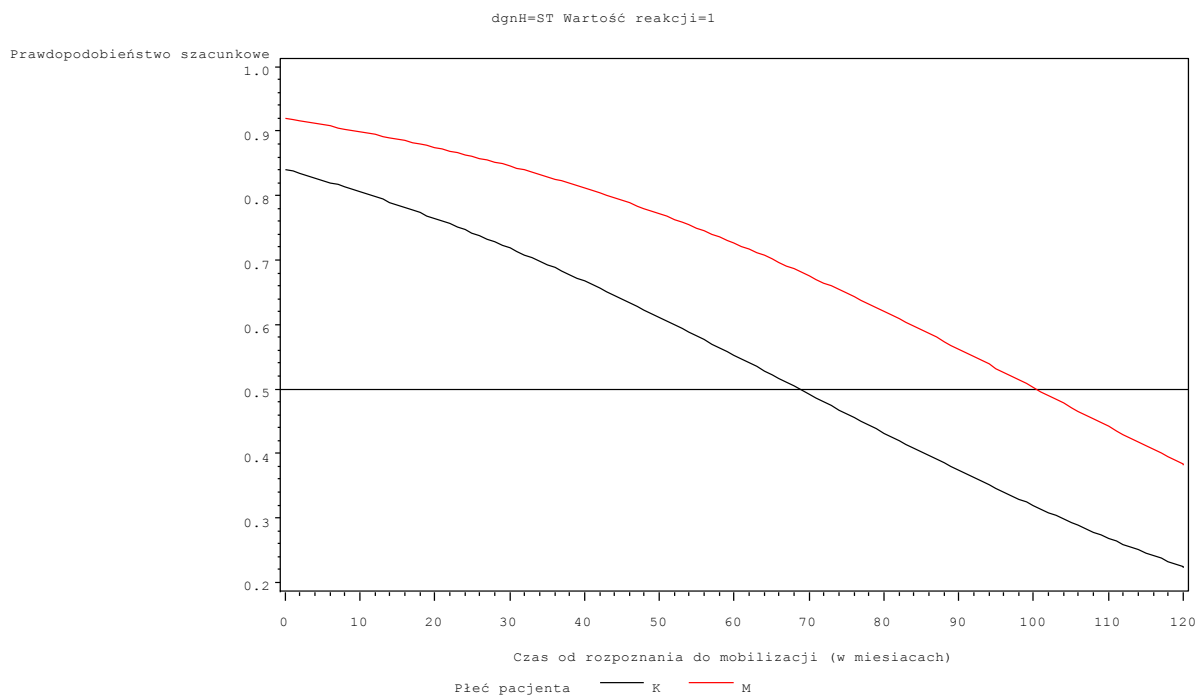
Suma z p	czynnik					
model	czas od rozp	steady state	dawka G-CSF	dawka*czy_ss	dgn H	pleć
2.1	0,0287	0,1402	0,2013	0,1720	0,0436	0,0295
2.2	0,0190				0,0210	
2.3	0,0293				0,0349	0,0804

Tabela 5.2 Modele prawdopodobieństwa w modelowaniu 2. Na czerwono zaznaczono czynniki istotne statystycznie. Czas od rozp – czas od rozpoznania do mobilizacji, steady state – mobilizacja wyłącznie G-CSF, dawka\*czy\_ss – kombinacja dawki w powiązaniu z rodzajem mobilizacji, dgn H – rodzaj choroby podstawowej po wprowadzeniu podziału na nowotwory hematologiczne (H) i guzy lite (ST).

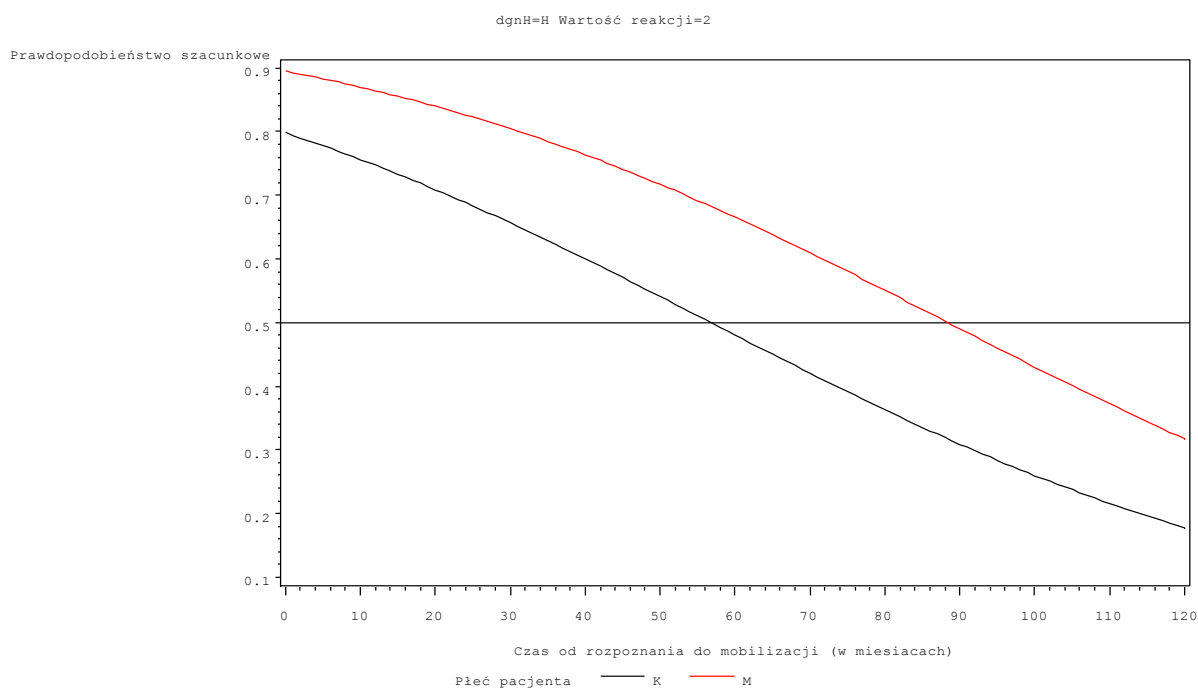
Na podstawie tego modelowania przedstawiono graficznie wyniki analizy prawdopodobieństwa uzyskania wystarczającej ( $>2 \cdot 10^6/\text{kg m.c.}$ ), optymalnej ( $>3 \cdot 10^6/\text{kg m.c.}$ ) oraz optymalnej liczby komórek w trakcie 1 separacji (wykresy 5.21-5.26).



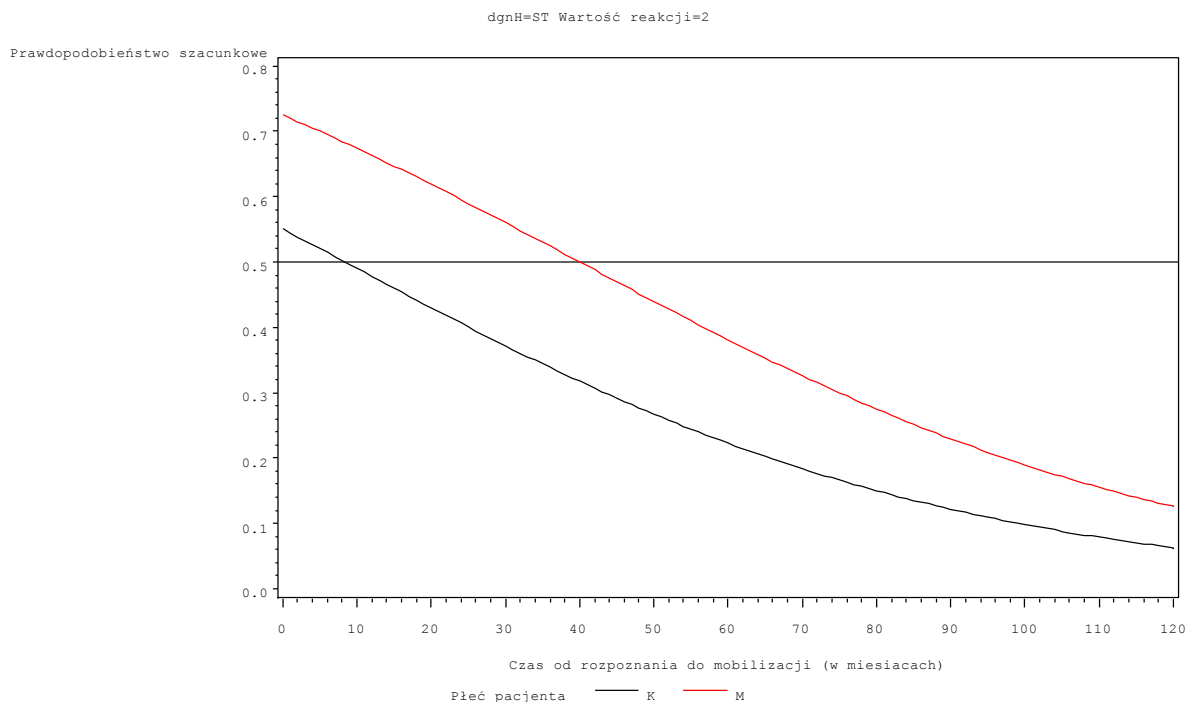
Wykres 5.21 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $2 \cdot 10^6/\text{kg m.c.}$  (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.



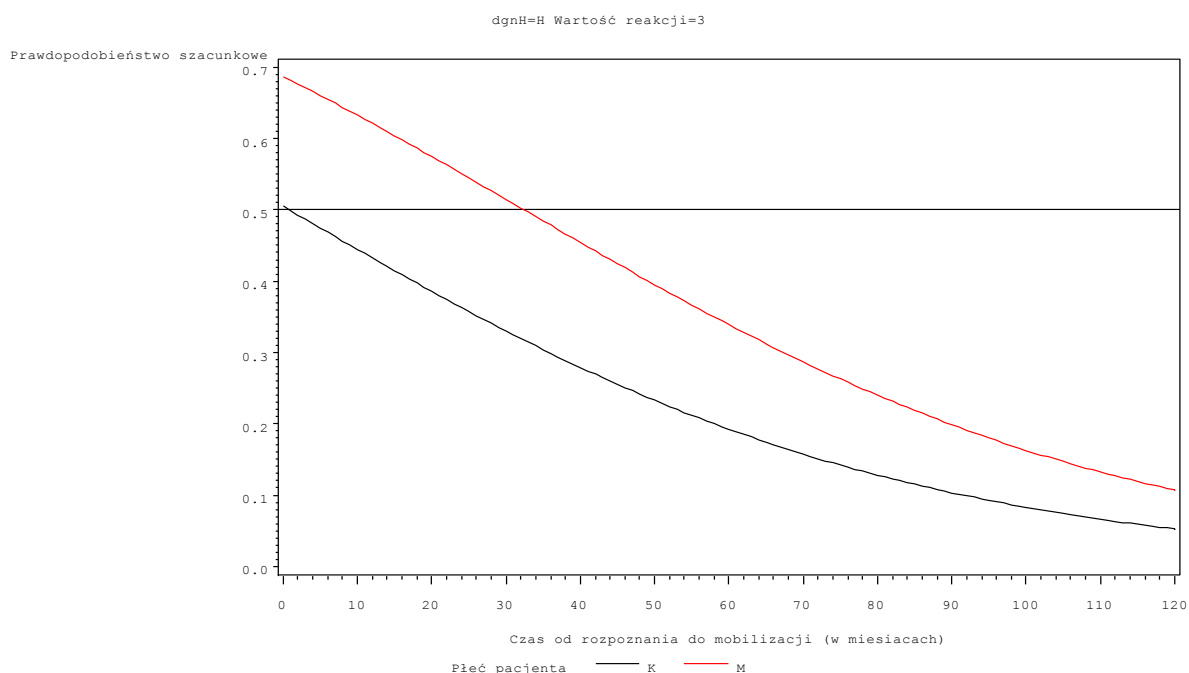
Wykres 5.22 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $2 \cdot 10^6$ /kg m.c. (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.



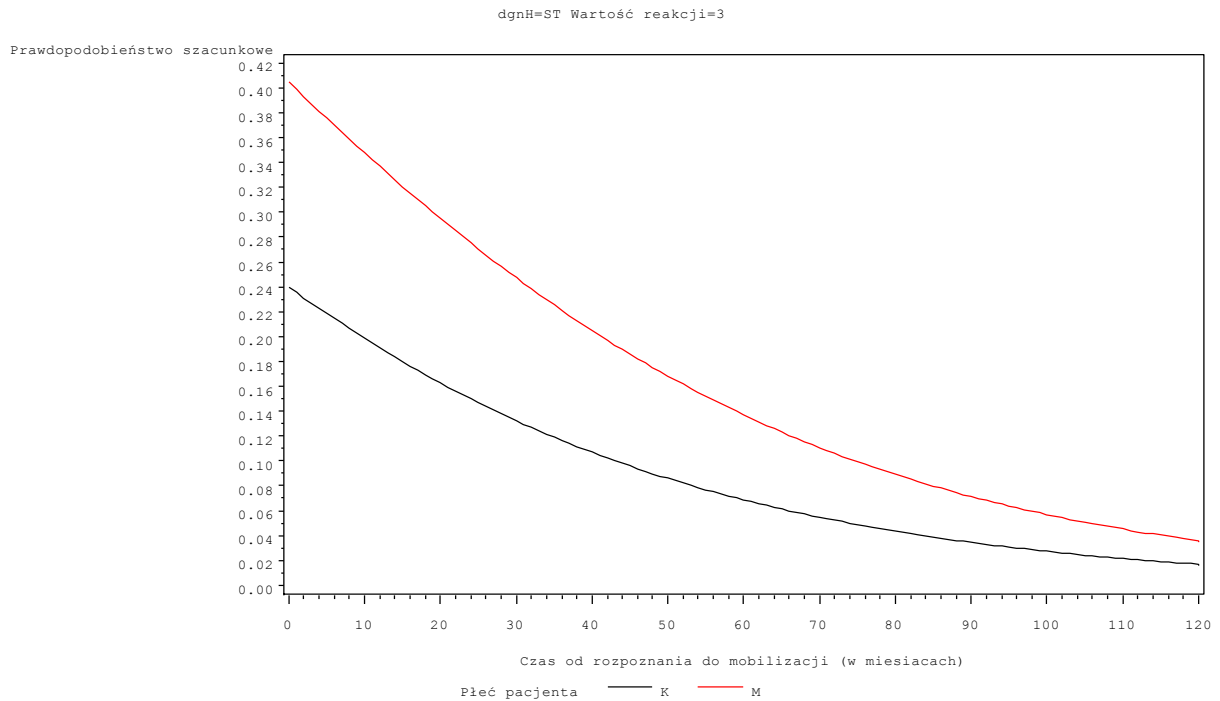
Wykres 5.23 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6$ /kg m.c. (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.



Wykres 5.24 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6$ /kg m.c. (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.



Wykres 5.25 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6$ /kg m.c. w trakcie jednej aferezy (stopień 3. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.



Wykres 5.26 Prawdopodobieństwo uzyskania min  $3 \cdot 10^6/\text{kg}$  m.c. w trakcie jednej aferezy (stopień 3. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.

## 6. DYSKUSJA

### 6.1. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

#### 6.1.1. Wpływ dawki G-CSF na liczbę leukocytów w mobilizowanej krwi obwodowej.

W stanie homeostazy organizmu leukocytoza u myszy zawiera się w granicach 1,7 – 15 tysięcy komórek/ $\mu$ l [13]. Obserwowano różnice w ilości leukocytów we krwi obwodowej u myszy niestymulowanych w zależności od szczepu. U szczepów Balb/c, DBA i C57BL/6 leukocytoza niestymulowana przez G-CSF kształtowała się w granicach 10000-20000/ $\mu$ l, u myszy CBA – nieco ponad 20000/ $\mu$ l. Interesujące okazały się wyniki stymulacji G-CSF w obrębie poszczególnych badanych szczepów zwierząt doświadczalnych w zakresie wzrostu leukocytozy. W przypadku szczepu Balb/c obserwowano znaczący wzrost liczby leukocytów przy stymulacji G-CSF dopiero w dawce 500  $\mu$ g/kg lub wyższej (wykres 4.1, 4.2 i 4.3). Podobnie u myszy szczepu C57BL/6 odnotowano wzrost ilości leukocytów po stymulacji proporcjonalne do dawki G-CSF, jednak statystycznie istotna była dawka 500  $\mu$ g/kg lub wyższa (wykres 4.11, 4.12). Z kolei u myszy szczepu DBA w doświadczeniu nr 1 do znaczącego wzrostu leukocytozy wystarczająca okazała się już dawka 25  $\mu$ g/kg, dawka 100  $\mu$ g/kg powodowała niższy wzrost leukocytozy, z kolei 500  $\mu$ g/kg powodowała najwyższy wzrost leukocytozy (wykres 4.7). W doświadczeniu nr 2. dawka 25  $\mu$ g/kg powodowała niższy wzrost leukocytozy niż 100  $\mu$ g/kg, ale dla wyższych dawek G-CSF – 500  $\mu$ g/kg i 1000  $\mu$ g/kg - podobnie jak w doświadczeniu nr 1 - obserwowano największy wzrost ilości leukocytów. Różnica między 500, a 1000  $\mu$ g/kg nie była istotna, co mogłoby wskazywać na istnienie wysycającej dawki G-CSF wpływającej na wzrost leukocytozy (wykres 4.8). Najbardziej interesujące okazały się jednak wyniki eksperymentów w obrębie szczepu CBA. Po stymulacji za pomocą G-CSF praktycznie nie było odpowiedzi w postaci wzrostu leukocytozy w obydwu powtórzeniach, nawet przy najwyższych stosowanych w doświadczeniach dawkach (wykres 4.15 i 4.16).



### **6.1.2. Wpływ dawki G-CSF na liczbę komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej oraz zdolności komórek krwiotwórczych do proliferacji *in vitro*.**

Komórki krwiotwórcze zostały zidentyfikowane na podstawie markerów powierzchniowych, jak opisano powyżej (p. 3.1.4. str 23). Przyjmuje się, że komórki wykazujące ekspresję markerów Sca-1 i c-kit, przy jednoczesnym braku ekspresji antygenów charakterystycznych dla wyspecjalizowanych komórek krwi (lin), stanowią całkowitą pulę mysich macierzystych komórek krwiotwórczych [109]. Jednakże istnieją informacje, że komórki lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup> mogą być również klasyfikowane jako komórki macierzyste [82], co wynika z ich dużej różnorodności fenotypowej, zależnie od stadium proliferacji. Komórki te morfologicznie przypominają limfocyty, ale nie są one limfocytami i nie posiadają charakterystycznych dla limfocytów markerów powierzchniowych, przede wszystkim CD3. Zatem bezwzględną liczbę komórek macierzystych przedstawiono jako sumę komórek podwójnie pozytywnych (c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) i komórek c-kit pozytywnych (c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>) w populacji limfoidalnych komórek bez determinanty CD3 (CD3<sup>-</sup>).

U myszy szczepu Balb/c, jak wspomniano powyżej, obserwowano znaczący wzrost liczby leukocytów przy stymulacji G-CSF dopiero w dawce 500 µg/kg lub wyższej (wykres 4.1, 4.2 i 4.3). W doświadczeniu nr 1 odnotowano istotny statystycznie wzrost ilości komórek krwiotwórczych i progenitorowych po stymulacji dawkami 25 i 500 µg/kg, jednakże w kolejnych powtórzeniach dawka 25 µg/kg nie powodowała przyrostu komórek c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> i c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup> i znaczący ich przyrost odnotowano dopiero po stymulacji dawką 500 µg/kg i 1000 µg/kg. Ciekawą obserwacją jest fakt, że dwukrotne zwiększenie dawki G-CSF z 500 do 1000 µg/kg nie zwiększało znacząco ilości komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej. Mogłoby to oznaczać, że istnieje w zakresie testowanych dawek w szczepie Balb/c wartość dawki wysycającej, powyżej której nie obserwuje się dalszego przyrostu ilości komórek krwiotwórczych we krwi obwodowej.

Badanie zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach *in vitro* wydaje się potwierdzać wyniki otrzymane za pomocą cytometrii przepływowej prezentowane powyżej. We wszystkich trzech powtórzeniach znacząco więcej kolonii zaobserwowano po stymulacji dawką 500 µg/kg, przy czym wyraźnie

wzrastała ilość jednostek tworzących skupiska erytrocytów (BFU-E). Zjawisko wzrostu ilości BFU-E pod wpływem stymulujących dawek G-CSF obserwowane było także w innych badanych szczepach myszy. W doświadczeniu nr 3 ilość otrzymanych kolonii po stymulacji dawką 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  były praktycznie równe, co wydaje się potwierdzać obserwacje z cytometrii przepływowej, w której określano ilości komórek krwiotwórczych po stymulacji G-CSF we wzrastających dawkach i gdzie nie obserwowano znaczących różnic między stymulacją dawką 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Zatem wydaje się, że za dawkę dającą maksymalną stymulację wyrzutu komórek krwiotwórczych do krwi obwodowej u myszy szczepu Balb/c można uznać 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

U myszy szczepu DBA w doświadczeniu nr 1 obserwowano wzrost ilości komórek krwiotwórczych po stymulacji G-CSF dawką 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , podobnie jak 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , z gorszą odpowiedzią na pośrednią dawkę 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . W doświadczeniu nr 2 utrzymywała się podobna tendencja, przy czym odpowiedź na dawkę 25, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  była podobna (wykresy 4.9, 4.10). Jednakże różnice te nie były statystycznie istotne, być może ze względu na małą liczebność grup. Wpływ badanych dawek G-CSF na morfologię w doświadczeniu nr 1 był analogiczny jak na liczbę komórek krwiotwórczych, jednakże w doświadczeniu nr 2 obserwowano systematyczny wzrost leukocytozy pod wpływem wzrastających dawek G-CSF i nie obserwowano bezpośredniej korelacji ilości komórek c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> i c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup> z leukocytozą.

Wyniki zdolności do proliferacji w warunkach *in vitro* mobilizowanych komórek hematopoetycznych w doświadczeniach u myszy szczepu DBA dość dobrze odpowiadają wynikom badania ilości komórek krwiotwórczych w cytometrii przepływowej. W doświadczeniu nr 1 obserwuje się wzrost ilości jednostek tworzących kolonie już przy najmniejszej z badanych dawek G-CSF, z kolei przy dawce 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ilość CFU znacząco wzrasta, co spowodowane jest gwałtownym przyrostem jednostek tworzących skupiska erytrocytów. Jednakże w doświadczeniu nr 2 nie potwierdzono przewagi dawki 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nad pozostałymi badanymi dawkami i w zestawieniu z wynikami z cytometrii przepływowej wydaje się, że już dawka 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  powoduje silną mobilizację komórek krwiotwórczych do krwi obwodowej w tym szczepie myszy i kolejne zwielokrotnienia dawek G-CSF nie zwiększają znacząco skuteczności mobilizacji. Mogłoby to świadczyć, że dla myszy szczepu DBA optymalną dawką

25 µg/kg, powyżej której nie obserwujemy dalszego przyrostu ilości komórek krwiotwórczych pomimo wzrostu leukocytozy.

W doświadczeniach na myszach szczepu C57BL/6 odnotowano wzrost ilości leukocytów po stymulacji proporcjonalnie do zwielokrotniania dawki G-CSF, jednak statystycznie istotny był wpływ dawki 500 µg/kg lub wyższej (wykres 4.11, 4.12). Natomiast wzrost ilości komórek krwiotwórczych i progenitorowych obserwowano wraz ze zwiększaniem dawki G-CSF do górnej wartości granicznej, powyżej której nie stwierdzano dalszego przyrostu ilości komórek c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> i c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>. W doświadczeniu nr 1 dawką tą było 100 µg/kg, w doświadczeniu nr 2 - 500 µg/kg. Jednakże statystycznie istotną różnicę potwierdzającą te tendencje odnotowano tylko w doświadczeniu nr 2. Być może optymalna dawka G-CSF dla szczepu C57BL/6 zawiera się w przedziale pomiędzy 100 i 500 µg/kg.

Z kolei na podstawie wyników proliferacji w warunkach *in vitro* mobilizowanych komórek hematopoetycznych stwierdzano znaczny wzrost ilości jednostek tworzących kolonie już pod wpływem dawki 25 µg/kg. Szczególnie jest to widoczne w doświadczeniu nr 2, gdzie dalszy wzrost dawki G-CSF nie powodował już przyrostu kolonii, ani nie wpływał na wzajemne proporcje poszczególnych typów kolonii.

Najbardziej interesujące wyniki otrzymano u myszy szczepu CBA. W wyniku stymulacji G-CSF, podczas gdy leukocytoza nie wzrastała nawet przy stymulacji najwyższymi z badanych dawek, ilość komórek krwiotwórczych zwiększała się wraz z dawką czynnika. Znaczący wzrost w obu powtórzeniach uzyskano dopiero przy dawce G-CSF 500 µg/kg, a dla dawki 1000 µg/kg obserwowano najwyższą liczbę komórek krwiotwórczych i na podstawie powyższych doświadczeń nie udało się określić najwyższej, wysycającej dawki G-CSF.

Analizując zdolność do proliferacji *in vitro* komórek krwiotwórczych u myszy szczepu CBA na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, można wyznaczyć graniczną dawkę G-CSF, powyżej której nie obserwuje się dalszego przyrostu ilości jednostek tworzących kolonie. W przypadku doświadczenia nr 1 taką dawkę stanowi już 100 µg/kg, w przypadku doświadczenia nr 2 - 500 µg/kg, choć różnice nie są znaczące.

Prawdopodobnie większa ilość powtórzeń lub zbadanie dawek pośrednich pozwoliłoby potwierdzić ten trend.

### **6.1.3. Wpływ dawki G-CSF na zdolność komórek krwiotwórczych do proliferacji i odnowy hematopoezy *in vivo*.**

Najlepszą metodą testowania potencjału proliferacyjnego komórek krwiotwórczych jest badanie *in vivo*, jako metoda, w której uzyskujemy informacje o końcowej skuteczności mobilizacji komórek hematopoetycznych. W przebiegu doświadczeń u myszy dwóch spośród testowanych w poprzednich doświadczeniach szczepów – Balb/c i CBA – wykonano syngeniczne przeszczepienie komórek otrzymanych w wyniku ich mobilizacji różnymi, wzrastającymi dawkami G-CSF u napromienionych subletalnie zwierząt.

Doświadczenia przeprowadzono w dwóch powtórzeniach dla każdego ze szczepów. U myszy Balb/c w doświadczeniu nr 1 można zauważyć tendencję szybszej odnowy leukocytozy w grupie, która otrzymała komórki mobilizowane dawką 500 µg/kg jednak różnice nie były statystycznie istotne. W doświadczeniu nr 2, w którym zastosowano kolejną dawkę G-CSF – 1000 µg/kg, począwszy od dawki 100 µg/kg można zauważyć trend szybszej odnowy leukocytozy w dobie +7. U myszy, które otrzymały przeszczepienie komórek krwiotwórczych mobilizowanych dawką 500 i 1000 µg/kg, w 7 dniu po przeszczepieniu obserwowano odpowiednio wyższe leukocytozy, jednakże różnica między dawkami 500 i 1000 µg/kg nie była znamienna statystycznie. Jednakże w dobie +10 nie udało się utrzymać przy życiu wszystkich myszy i poszczególne grupy miały niewielką liczebność, co mogło mieć wpływ na wyniki w +10 dobie niezgodne z oczekiwaniami i dotychczasowym przebiegiem doświadczenia. Dlatego dla oceny szybkości wszczepiania komórek krwiotwórczych i potencjału zasiedlania przez nie nisz biologicznych oceniono ilość kolonii śledzionowych w dobie +11 po przeszczepieniu. Wykazano zwiększające się ilości kolonii w obu doświadczeniach, począwszy od dawki 100 µg/kg, przy czym w doświadczeniu nr 2 nie było różnic między dawkami 500 i 1000 µg/kg.

U myszy CBA w doświadczeniu nr 1 w dobie +7 zaobserwowano znacząco wyższą leukocytozę w przypadku dawki 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Niestety nie udało się utrzymać hodowli do +10 doby i nie udało się potwierdzić tej tendencji w dalszym ciągu doświadczenia. W doświadczeniu nr 2 począwszy od dawki 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  można zauważyć trend szybszej odnowy leukocytozy w dobie +10, pod wpływem dawki 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w +10 dobie u przeszczepionych myszy obserwowano odpowiednio wyższe leukocytozy. Statystycznie istotne różnice obserwowano w +10 dobie między grupą 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a wszystkimi pozostałymi grupami.

Szybkość odnowy hematopoezy, szczególnie w układzie leukocytarnym, ma pierwszorzędne znaczenie dla bezpieczeństwa procedury przeszczepienia poprzez skrócenie nadiru leukopenii i narażenia na zagrażające życiu infekcje. Uważa się, że mobilizowane komórki krwiotwórcze w porównaniu z komórkami pozyskanymi ze szpiku kostnego pozwalają na szybsze wszczepienie oraz zmniejszone ryzyko procedury, w porównaniu do komórek otrzymanych ze szpiku kostnego [20]. W wielu badaniach wykazano kliniczne różnice między komórkami pochodzącymi ze szpiku kostnego i z krwi obwodowej. Najważniejsza dotyczyła kinetyki wszczepiania komórek krwiotwórczych i zdolności odtwarzania układu białokrwinkowego i płytkotwórczego [9,21]. Dlatego mobilizowane komórki krwiotwórcze są preferowanym źródłem komórek macierzystych i progenitorowych do przeszczepień autologicznych.

Doświadczenia z przeszczepieniem syngenicznych komórek krwiotwórczych uzyskanych w wyniku mobilizacji różnymi, wzrastającymi dawkami G-CSF miały na celu pośrednią odpowiedź na pytanie czy istnieją różnice w dynamice wzrostu leukocytozy u myszy, u których po subletalnym napromienieniu przeszczepiono syngeniczne komórki krwiotwórcze mobilizowane różnymi dawkami G-CSF. Podjęto próbę wyznaczenia optymalnej dawki czynnika mobilizującego, po przekroczeniu której skuteczność mobilizacji nie wzrasta lub nawet maleje. Z kolei zbyt mała dawka czynnika mobilizującego mogłaby nie prowadzić do skutecznej mobilizacji, czyli nie pozwolić uzyskać wystarczającej i bezpiecznej liczby komórek krwiotwórczych. Pomijając wpływ czynników zakłócających doświadczenia można by spodziewać się wyższych leukocytoz w badaniach wykonywanych w kolejnych dobach w grupach, w których zastosowano optymalną dawkę G-CSF.

Warto wspomnieć, że w doświadczeniach można było zastosować 2 strategie. W pierwszym wariantcie do przeszczepienia w każdej z badanych grup można użyć stałej liczby komórek jednojądrzastych mobilizowanych wzrastającymi dawkami G-CSF. W tej ilości komórek jednojądrzastych spodziewamy się innej ilości komórek progenitorowych i macierzystych, ale nie jest pewne, że im wyższa ilość badanych komórek tym lepsza skuteczność mobilizacji i następowo przeszczepienia tych komórek. Taka strategia pozwala sprawdzić jak zmienia się potencjał proliferacyjny różnych dawek G-CSF. W drugim przypadku należałoby do przeszczepienia zastosować stałą liczbę komórek c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> i c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>-</sup>. Wówczas można zbadać czy istnieją różnice „jakościowe” komórek uzyskanych w wyniku mobilizacji wzrastającymi dawkami G-CSF. Jednakże takie podejście wymagałoby znacznie więcej komórek, których uzyskanie w warunkach przeprowadzanych doświadczeń było niemożliwe. Przyjęto więc stałą liczbę komórek jednojądrzastych użytych do przeszczepienia.

W szczepie myszy Balb/c na podstawie wyników otrzymanych w układzie *in vitro* oraz *in vivo* wydaje się, że optymalną dawką G-CSF może być dawka 500 µg/kg. Powyżej tej dawki nie obserwowano wzrostu skuteczności mobilizacji, zarówno w zakresie ilości otrzymanych komórek krwiotwórczych, jak i ich potencjału proliferacyjnego. Szczep ten mógłby być modelem słabej mobilizacji („*poor mobilizer*”) ze względu na fakt, że dopiero duże dawki G-CSF stymulują wyrzut macierzystych komórek krwiotwórczych, pomimo wzrostu leukocytozy wraz ze zwiększaniem dawki G-CSF.

U myszy szczepu CBA nie udało się uchwycić jednoznacznie optymalnej dawki G-CSF. Największy potencjał mobilizacyjny wykazywała dawka 1000 µg/kg, choć nie jest wykluczone, że istnieje inna optymalna dawka w zakresie pomiędzy badanymi dawkami, ale nie udało się jej wyznaczyć. W tym szczepie myszy zaobserwowano nie opisywaną dotąd właściwość. Wraz z kolejnymi wielokrotnościami dawki nie wzrasta leukocytoza, przy wyraźnych wzrostach liczby komórek krwiotwórczych, co znalazło również potwierdzenie w doświadczeniach *in vivo*. Szczep ten mógłby być modelem „fałszywej” lub „pozornej” słabej mobilizacji, gdzie pomimo wzrostu dawki G-CSF nie przyrasta leukocytoza, choć przy zastosowaniu dużych dawek czynnika widoczny jest wzrost ilości macierzystych komórek krwiotwórczych

Z kolei u myszy szczepu C57BL/6 obserwowano systematyczny wzrost leukocytozy wraz ze zwiększającą się dawką G-CSF, natomiast liczba macierzystych komórek krwiotwórczych wzrastała tylko do pewnej dawki. Prawdopodobnie dawka optymalna zawiera się pomiędzy 100 a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Również interesujące okazały się wyniki w obrębie szczepu DBA. Tu również odnotowano niespójność między wpływem na leukocytozę – wzrastającą wraz ze zwiększaniem dawki G-CSF, a przyrostem macierzystych komórek krwiotwórczych. Najmniejsza z badanych dawek – 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  powodowała wzrost ilości macierzystych komórek hematopoetycznych, ale kolejne zwielokrotnienia dawek nie pociągały za sobą dalszego ich przyrostu, choć obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

#### **6.1.4. Podsumowanie części doświadczalnej**

Na podstawie opisanych powyżej zależności można przyjąć, że najprawdopodobniej dla badanych szczepów istnieją optymalne do mobilizacji dawki G-CSF, których przekroczenie nie zwiększa skutecznej mobilizacji, i poniżej których nie otrzymujemy maksymalnej, zdolnej do pełnej odnowy hematopoezy liczby macierzystych komórek krwiotwórczych.

Ponadto uzyskano potwierdzenie, że nie zawsze istnieje przełożenie pomiędzy wzrostem leukocytozy, a ilością komórek krwiotwórczych w badanych szczepach zwierząt doświadczalnych.

Kolejnym i nie opisywanym szczegółowo w literaturze zjawiskiem jest różny przebieg mobilizacji między badanymi szczepami myszy, jednocześnie przy dobrej powtarzalności w obrębie poszczególnych szczepów. Biorąc pod uwagę, że szczepy myszy mogą z pewnym przybliżeniem reprezentować pojedynczego osobnika dzięki homogenności genetycznej, być może pośrednio można potwierdzić indywidualny przebieg mobilizacji i różną wrażliwość na G-CSF u człowieka. W podobny sposób wreszcie można tłumaczyć zjawisko indywidualnej słabej mobilizacji (tzw. „*poor mobilizers*”) opisanej w części wstępnej pracy.

## 6.2. SKUTECZNOŚĆ RÓŻNYCH DAWEK G-CSF W OBSERWACJI KLINICZNEJ

Pomimo dość dobrego poznania procesu przemian toczących się w podścielisku szpiku kostnego w odpowiedzi na aktywację neutrofilów i osteoblastów przez czynnik stresowy jakim jest np. chemioterapia lub na powtarzalną stymulację za pomocą cytokin, np. G-CSF [47,54] optymalna metoda mobilizacji nie została dotychczas określona i możliwe są różne podejścia [36,69]. Najczęściej stosuje się metodę stymulacji dawcy za pomocą G-CSF w dawkach o rozpiętości między 3-32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a komórki krwiotwórcze pobiera się między czwartym, a szóstym dniem mobilizacji. [10,23,29,35,96]. Również nie została jednoznacznie określona optymalna ilość komórek CD34+, którą należy zebrać w wyniku mobilizacji. Pacjenci, którym przeszczepiono ponad  $2 \times 10^6$  komórek CD34+/kg wykazywali się szybkim wszczepieniem i trwałą odnową hematopoezy [10,67,106]. Wg innych autorów optymalną dawką komórek CD34+/kg było powyżej  $3 \times 10^6/\text{kg}$  [87]. Najczęściej przyjmuje się, że ilość CD34+ powyżej  $2 \times 10^6/\text{kg}$  jest wymagana do zapewnienia rekonstrukcji hematopoezy po chemioterapii mieloablacyjnej [74,48]. Dlatego w analizach przyjęto uzyskanie w wyniku aferez co najmniej  $2 \times 10^6/\text{kg}$  komórek CD34+ jako minimalną wystarczającą liczbę do zapewnienia rekonstrukcji krwiotworzenia. Mobilizacja zakończona uzyskaniem takiej liczby komórek CD34+ uznana została za skuteczną. Z kolei, jeżeli w wyniku mobilizacji uzyskano od  $3 \times 10^6/\text{kg}$  CD34+, uznano mobilizację za optymalną.

W pierwszej części przeprowadzono analizę jednoczynnikową. Przebadano wpływ poszczególnych czynników na skuteczność i możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek CD34+. Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu: dawki G-CSF, a także rodzaju mobilizacji (G-CSF vs G-CSF + chemioterapia), rodzaju choroby (hematologiczne vs guzy lite) oraz czasu od rozpoznania do mobilizacji na skuteczność mobilizacji, zarówno na uzyskanie minimalnej, jak i optymalnej liczby komórek CD34+. Zaobserwowano natomiast istotny statystycznie wpływ płci na skuteczność mobilizacji. Możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek CD34+ była większa u chłopców ( $p=0,031$ ), jednakże prawdopodobieństwo osiągnięcia optymalnej liczby komórek w zależności od płci nie różniło się statystycznie.



Wpływ płci na skuteczność mobilizacji został opisany w literaturze. W badaniach Zhanga i wsp. prowadzonych na populacji dzieci, młodzieży i dorosłych pośród innych czynników wpływających na mobilizację wykazano, że lepiej mobilizowali się mężczyźni [116]. Dotąd jednak nie zostały poznane czynniki jednoznacznie wpływające na skuteczną mobilizację komórek krwiotwórczych, a większość prac prowadzona była w populacji dorosłych. Wyniki tych doniesień nie mogą być jednoznacznie odnoszone do populacji dziecięcej. Przede wszystkim z powodu odmienności między innymi w zakresie wskazań do leczenia za pomocą wysokodawkowanej terapii wspomaganą przeszczepieniem autologicznych komórek krwiotwórczych oraz rodzaju terapii poprzedzającej ich mobilizację i separację. Doświadczenia w grupach dorosłych pacjentów dotyczą głównie chorych na szpiczaka mnogiego, chłoniaki złośliwe, czy białaczki [39,57,74]. Natomiast u dzieci główne wskazanie do tego sposobu leczenia stanowią guzy łagodne typowe dla wieku dziecięcego, jak: zwojak zarodkowy, mięsak Ewinga, guzy mózgu czy inne [30,53,107]. Znaczące mogą być także różnice w oddziaływaniach pomiędzy podścieliskiem a komórkami układu krwiotworzenia u dorosłych i u dzieci. W jednym badaniu po mobilizacji za pomocą G-CSF u dawców poniżej 18 roku życia uzyskano porównywalną liczbę komórek CD34+ jak u dawców powyżej 18 lat. Jednakże znacząco wyższy odsetek młodszych pacjentów uzyskało pożądaną liczbę CD34+ w jednej aferezie (56 vs 39%) [88]. Z kolei w badaniach Zhanga i wsp. wykazano, że więcej komórek CD34+ można było uzyskać u dorosłych w porównaniu z grupą dzieci i młodzieży [116]. Wśród pacjentów dorosłych związek między wiekiem dawcy i mobilizacją CD34+ jest niejasny [4,105].

W doniesieniach literaturowych w grupie zdrowych dawców pediatrycznych wykazano, że czynnikami zwiększającymi skuteczność mobilizacji były młodszy wiek i przeprowadzenie aferezy dużej objętości [25]. W innym badaniu zdrowych dawców Hiszpańskiego Narodowego Rejestru Dawców przeprowadzonym w grupie 261 zdrowych dawców w wieku 2-72 lat w analizie wieloczynnikowej wykazano, że wiek >38 lat oraz sposób dawkowania G-CSF (1 raz dziennie) były czynnikami niekorzystnymi prognostycznie co do zebrania  $>4 \cdot 10^6$  CD34+/kg [88]. Z kolei w grupie 129 zdrowych dawców rodzinnych w wieku od 19 do 70 lat jedynym czynnikiem statystycznie istotnie wpływającym na ilość zebranych komórek CD34+ była dawka G-CSF [56].

O skuteczności mobilizacji może zatem decydować wiele czynników. Ich wzajemne współzależności uniemożliwiają ustalenie pojedynczych zmiennych (np. dawka G-CSF) mających istotny wpływ na skuteczność mobilizacji. W przedstawianej tu pracy zastosowano uogólnioną regresję logistyczną w celu oceny równoczesnego wpływu wielu czynników na skuteczność mobilizacji w badanej populacji i wyodrębnienia tych z nich, których wpływ mógłby być istotny statystycznie, a następnie stworzenia modelu oceny prawdopodobieństwa skutecznej mobilizacji, jak opisano w punkcie 5.3 niniejszej pracy.

Brano pod uwagę następujące czynniki mogące mieć wpływ na skuteczność mobilizacji: czas od rozpoznania do mobilizacji, rodzaj mobilizacji (wyłącznie G-CSF vs G-CSF + chemioterapia), dawka G-CSF, kombinacja dawki w powiązaniu z rodzajem mobilizacji, grupa rozpoznań (H – hematologiczne, NB – zwojak współczulny zarodkowy, SE – mięsak Ewinga, BT – guzy mózgu, I – inne), radioterapia przed mobilizacją, płeć i wiek.

Przeprowadzono kolejne modelowania, uwzględniając początkowo wszystkie w/w czynniki. Następnie eliminowano czynniki nieistotne statystycznie. W dalszej analizie pozostawiono czynniki istotne w analizie wstępnej oraz czynniki, których ocena znaczenia była celem pracy. Ostatecznie w wyniku modelowania nie stwierdzono istotnego wpływu dawki G-CSF (jako zmiennej ciągłej i jako zmiennej skategoryzowanej) na skuteczność mobilizacji. Na otrzymane wyniki może mieć wpływ niejednorodność badanej grupy szczególnie pod względem spektrum chorób. Istotny statystycznie okazał się wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji oraz rodzaj diagnozy (choroby hematologiczne vs guzy lite). Większe prawdopodobieństwo skutecznej mobilizacji zachodzi, jeśli czas od rozpoznania do mobilizacji jest krótszy oraz u pacjentów z chorobami hematologicznymi. Pewna część pacjentów była kierowana do mobilizacji po wielomiesięcznym lub nawet kilkuletnim leczeniu poprzedzającym mobilizację. Stąd wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji na jej skuteczność. Obciążenie pacjenta wieloma cyklami chemioterapii przed próbą zebrania komórek krwiotwórczych do przeszczepienia stanowi znany czynnik ryzyka słabej mobilizacji [19].

Stwierdzono również wpływ płci na skuteczność mobilizacji. Zaobserwowano trend ( $p=0,08$ ) do skuteczniejszej mobilizacji u chłopców. Modele oceny prawdopodobieństwa przedstawiono na rys 5.21-5.26.

W obserwowanej grupie dzieci łącznie u 15% pacjentów nie udało się uzyskać wystarczającej liczby komórek CD34+ pozwalającej na rozpoczęcie aferezy lub minimalnej zabezpieczającej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku pierwszego cyklu mobilizacji. Ilość pacjentów słabo mobilizujących się („poor mobilizers”) w niniejszym opracowaniu nie odbiegała od danych opisywanych w literaturze [99,100]. Pusic i wsp. donosi, że u 19% dorosłych pacjentów z chłoniakiem mobilizowanych samym G-CSF nie udało się uzyskać powyżej  $2 \times 10^6$  CD34+ w pięciu kolejnych aferezach [83]. Z kolei w badaniach Wuchtera i wsp. 15% pacjentów nie osiągnęło stężenia komórek CD34+ powyżej 20/ $\mu$ l po mobilizacji po chemioterapii i G-CSF, co kwalifikowało ich jako słabo mobilizujących się [114]. W innym badaniu w wyniku mobilizacji za pomocą pojedynczej dawki pegyłowanego G-CSF uzyskano odpowiednią do autoprzeszczepienia ilość komórek CD34+ u 83% pacjentów [16].

Pomimo wielu lat obserwacji nie ustalono dotąd jednoznacznych czynników pozwalających przewidzieć skuteczność mobilizacji. Ich określenie jest istotne ze względu na fakt, że nadal u około 15-30% pacjentów nie udaje się skuteczna mobilizacja. Przedłuża to terapię, powodując wydłużenie przerw między cyklami leczenia w oczekiwaniu na zebranie potrzebnej do autoprzeszczepienia liczby komórek CD34+. Nie udało się jednoznacznie ocenić, który ze sposobów mobilizacji (tylko za pomocą czynnika wzrostu, czy łącznego stosowania chemioterapii i czynników wzrostu) jest bardziej skuteczny w pozyskaniu komórek krwiotwórczych do przeszczepienia autologicznego. Wynika to między innymi z różnorodności proponowanych programów mobilizacji, a także bardzo dużej różnorodności stanu klinicznego pacjentów kwalifikowanych do mobilizacji komórek krwiotwórczych [20,33]. Wykorzystywane do mobilizacji protokoły leczenia złożonego zawierają bardzo zróżnicowane zestawy chemioterapeutyków, a zakres stosowanego dawkowania G-CSF jest szczególnie szeroki, obejmując wartości od 3 do 32  $\mu$ g/kg/dzień [23,46,57]. Ponadto na skuteczność kolekcji komórek krwiotwórczych może mieć wpływ rodzaj użytego do aferezy separatora komórkowego i jego parametry techniczne [34,38].

W prezentowanej grupie pacjentów separacje wykonywano na separatorze Baxter Fenwal CS-3000 Plus. Wśród czynników klinicznych mogących mieć wpływ na skuteczność mobilizacji wymienia się najczęściej wiek pacjentów i ich stan kliniczny, rodzaj choroby i stopień jej zaawansowania, rodzaj i ilość kursów terapii (radio-, czy chemioterapii) w okresie poprzedzającym mobilizację oraz czas od rozpoznania choroby do mobilizacji [32,52,74]. W badanej grupie dzieci czas od rozpoznania do mobilizacji w powiązaniu z rodzajem choroby wpływał istotnie na skuteczność mobilizacji. Wydaje się to mieć związek z ilością cykli chemioterapii poprzedzających próbę uzyskania komórek krwiotwórczych do przeszczepienia. Pacjenci, u których w związku z dłuższą trwającą chorobą podawano dłuższą chemioterapię, mobilizowali się trudniej. Znajduje to również potwierdzenie w literaturze [19,79]. Należy wziąć pod uwagę, że w badanej populacji była grupa dzieci, które do mobilizacji były kierowane szczególnie późno. Pacjenci ci byli poddawani leczeniu wg różnych protokołów terapeutycznych zanim wprowadzono auto-HSCT w danych wskazaniach. Szczególnie dotyczy to dzieci ze zwojakiem zarodkowym. Może to także rzutować na całość otrzymanych wyników. Być może gdyby grupa pacjentów była bardziej jednorodna pod względem rozpoznania i czasu wcześniejszej terapii, efekt wpływu dawki G-CSF byłby bardziej jednoznaczny.

Należy także podkreślić, że miarą rzeczywistej skuteczności mobilizacji komórek krwiotwórczych do ich przeszczepienia autologicznego jest ostateczny wynik leczenia danego pacjenta. Według danych literaturowych większe trudności w pozyskaniu optymalnej do przeszczepienia liczby komórek krwiotwórczych przekładają się na gorsze wskaźniki przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby, a rodzaj i sposób mobilizacji nie pozostaje bez wpływu na szeroko pojęty problem rekonstytucji krwiotworzenia po transplantacji [90,101,104]. Dlatego dalsze zrozumienie procesów związanych z mobilizacją komórek krwiotwórczych ze szpiku kostnego może być bardzo przydatne w opracowaniu skuteczniejszych i wydajniejszych protokołów mobilizacji także dzięki wykorzystaniu nowych leków [26]. Zapewni to większą dostępność, a także bezpieczeństwo i ekonomizację leczenia za pomocą przeszczepienia autologicznych komórek krwiotwórczych.

### 6.3 PODSUMOWANIE

Tworzenie modeli eksperymentalnych z zastosowaniem wsobnych szczepów myszy jest nieocenioną pomocą w badaniach medycznych umożliwiającą eliminację wielu czynników zakłócających analizę wpływu ocenianego parametru na badane zjawisko. W niniejszej pracy poprzez wykorzystanie czterech różnych szczepów zwierząt doświadczalnych podjęto próbę stworzenia takiego modelu, w którym jedynym czynnikiem różnicującym byłaby dawka G-CSF, eliminując inne zmienne. Posłużyło to ocenie wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji komórek krwiotwórczych. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach wykazano, że mogą istnieć optymalne dawki G-CSF dla najskuteczniejszej mobilizacji. Z kolei w obserwacji klinicznej nie wykazano wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji. Jednakże w heterogennej grupie pacjentów nie była możliwa eliminacja różnic dotyczących innych znanych i opisywanych czynników wpływających zarówno na skuteczność mobilizacji, jak i mogących być źródłem słabej mobilizacji. W obserwacji pacjentów wykazano, że inne niż dawka G-CSF czynniki najsilniej wpływały na skuteczność mobilizacji. Był to czas od rozpoznania do mobilizacji w powiązaniu z rodzajem choroby. Potwierdzono także, że u pewnych pacjentów nie udaje się mobilizacja z użyciem G-CSF, co stanowi kolejną przesłankę do poszukiwania wydajniejszych protokołów mobilizacji i nowych leków mobilizujących.

## 7. WNIOSKI

- Na podstawie opisanych powyżej zależności można przyjąć, że dla badanych szczepów istnieją optymalne do mobilizacji dawki G-CSF.
- Uzyskano potwierdzenie, że nie zawsze istnieje przełożenie pomiędzy wzrostem leukocytozy, a ilością komórek krwiotwórczych w badanych szczepach zwierząt doświadczalnych.
- Przebieg mobilizacji między badanymi szczepami myszy jest różny, jednocześnie przy dobrej powtarzalności w obrębie poszczególnych szczepów.
- Przebieg mobilizacji komórek krwiotwórczych u myszy szczepów Balb/c i CBA może być modelem mobilizacji u pacjentów słabo mobilizujących się („*poor mobilisers*”).
- W obserwacji klinicznej nie wykazano wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji.
- W obserwacji pacjentów wykazano, że na skuteczność mobilizacji najsilniej wpływały czas od rozpoznania do mobilizacji w powiązaniu z rodzajem choroby.
- Potwierdzono, że u pewnych pacjentów nie udaje się mobilizacja z użyciem G-CSF.
- Niezbędne są dalsze badania prowadzące do opracowania wydajniejszych protokołów mobilizacji komórek krwiotwórczych.

## 8. STRESZCZENIE

Obecnie w przeszczepieniu autologicznych komórek krwiotwórczych (auto-HSCT) dominuje wykorzystanie mobilizowanych za pomocą G-CSF komórek krwiotwórczych krwi obwodowej (PBSC). Pomimo, że zjawisko mobilizacji jest stosunkowo dobrze poznane, nadal u pewnej grupy pacjentów nie udaje się uzyskać wystarczającej liczby PBSC do przeszczepienia, co stanowi podstawowe ograniczenie tej metody leczniczej. Nie został ustalony jeden schemat mobilizacji. Nie jest ustalona także optymalna dawka czynnika.

Celem pracy była ocena wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji w modelu eksperymentalnym u różnych szczepów myszy i w obserwacji klinicznej u dzieci leczonych z powodu różnych chorób onko-hematologicznych oraz znalezienie innych czynników wpływających na skuteczność i możliwość optymalnej mobilizacji w grupie obserwowanych pacjentów.

W badaniach doświadczalnych szczepy myszy: Balb/c, DBA, C57BL/6 i CBA stymulowano dawkami G-CSF: 0, 25, 100, 500 i 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  przez 5 dni, oceniano leukocytozę, ilość komórek krwiotwórczych oraz klonogenność. U myszy szczepów Balb/c i CBA wykonano syngeniczne przeszczepienie uzyskanych komórek obserwując rekonstytucję hematopoezy i tworzenie kolonii śledzionowych w celu oceny kinetyki wszczepiania i pośrednio potencjału proliferacyjnego komórek uzyskanych pod wpływem różnych dawek G-CSF. W części klinicznej przeprowadzono analizę retrospektywną u 82 pacjentów przygotowywanych do auto-HSCT. Oceniano uzyskanie minimalnej ( $2 \times 10^6/\text{kg}$  m.c. biorcy) lub optymalnej ( $3 \times 10^6/\text{kg}$  m.c. biorcy) liczby komórek CD34+. Przeprowadzono analizę jednoczynnikową, w której badano wpływ poszczególnych czynników na skuteczność mobilizacji oraz analizę wieloczynnikową za pomocą regresji logistycznej w celu oceny równoczesnego wpływu wielu czynników na skuteczność mobilizacji w badanej populacji i wyodrębnienia tych z nich, których wpływ mógłby być istotny statystycznie, a następnie stworzenia modelu oceny prawdopodobieństwa skutecznej mobilizacji.

Na podstawie wyników *in vitro* i *in vivo* u myszy Balb/c optymalną dawką G-CSF było 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . U myszy DBA już 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  powodowało wzrost ilości komórek

krwiotwórczych bez dalszego przyrostu wraz ze zwiększeniem G-CSF i przy wzroście leukocytozy. U myszy szczepu C57BL/6 obserwowano wzrost leukocytozy wraz z dawką G-CSF, natomiast liczba komórek krwiotwórczych wzrastała tylko do dawki pomiędzy 100 a 500 µg/kg. Z kolei u myszy CBA leukocytoza nie wzrastała po stymulacji wzrastającymi dawkami G-CSF, obserwowano natomiast wzrost ilości komórek krwiotwórczych, bez dawki optymalnej w badanym zakresie. W wyniku przeszczepień u myszy Balb/c potwierdzono, że optymalną dawką mobilizującą G-CSF może być dawka 500 µg/kg. U myszy CBA stwierdzono wyższą leukocytozę i szybsze wszczepianie po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych stymulowanych dawką 1000 µg/kg. W obserwacji klinicznej w analizie jednoczynnikowej nie stwierdzono istotnego wpływu: dawki G-CSF, a także rodzaju mobilizacji (G-CSF vs G-CSF + chemioterapia), rodzaju choroby (hematologiczne vs guzy lite) oraz czasu od rozpoznania do mobilizacji na skuteczność mobilizacji, zarówno na uzyskanie minimalnej, jak i optymalnej liczby komórek CD34+. Natomiast możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek CD34+ była istotnie większa u chłopców ( $p=0,031$ ). W wyniku analizy wieloczynnikowej nie stwierdzono istotnego wpływu dawki G-CSF na skuteczność mobilizacji. Istotny statystycznie był wpływ czasu od rozpoznania do mobilizacji oraz rodzaj diagnozy (choroby hematologiczne vs guzy lite). Zaobserwowano także trend ( $p=0,08$ ) do skuteczniejszej mobilizacji u chłopców. W obserwowanej grupie dzieci łącznie u 15% mobilizacja nie powiodła się.

Podsumowując można przyjąć, że dla badanych szczepów istnieją optymalne do mobilizacji dawki G-CSF. Zaobserwowano różny przebieg mobilizacji między badanymi szczepami myszy, przy dobrej powtarzalności w obrębie szczepów. Biorąc pod uwagę, że szczepy myszy mogą z pewnym przybliżeniem reprezentować pojedynczego osobnika dzięki homogenności genetycznej, być może pośrednio można wytłumaczyć indywidualny przebieg mobilizacji i różną wrażliwość na G-CSF u człowieka. W podobny sposób wreszcie można tłumaczyć zjawisko indywidualnej słabej mobilizacji (tzw. „*poor mobilizers*”). W klinicznej analizie retrospektywnej w badanej grupie dzieci czas od rozpoznania do mobilizacji w powiązaniu z rodzajem choroby wpływał istotnie na skuteczność mobilizacji. Pacjenci, u których w związku z dłuższą trwającą chorobą podawano dłuższą chemioterapię, mobilizowali się trudniej. Zaobserwowano także, że u



pewnych pacjentów nie udaje się mobilizacja z użyciem G-CSF, co stanowi przesłankę do poszukiwania wydajniejszych protokołów mobilizacji i nowych leków mobilizujących.

## 9. SUMMARY

Currently peripheral blood stem cells (PBSC) mobilized by G-CSF are mostly used in high-dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT). Despite of a good understanding of the mobilization process still there are difficulties to yield of sufficient number of PBSC for transplantation in certain group of patients, that remains important limiting factor of this way of treatment. Moreover there is no one established protocol of mobilization in patients. The optimal dose is also not determined.

The objective of the study was to assess the influence of G-CSF dose on mobilization efficacy in experimental model in different mice strains and in clinical observation in children treated for different onco-hematological diseases and to find out other factors influencing the mobilization efficacy in the observed group of patients.

In the experimental part the mice strains: Balb/c, DBA, C57BL/6 and CBA were stimulated with G-CSF in doses: 0, 25, 100, 500 and 1000 µg/kg for 5 consecutive days. White blood count (WBC), the number of hematopoietic cells and clonogenity were assessed. The obtained cells were used in syngenic transplantation in mice Balb/c and CBA and kinetics of the hematopoiesis reconstitution was observed to assess the proliferative potential of the cells obtained after stimulation with different G-CSF doses.

In the clinical part of the study the retrospective analysis was performed in 82 patients planned to auto-HSCT. Collection of at least 2 (optimally 3)  $\times 10^6$  CD34+ cells/kg body weight of recipient was assessed. Univariate and multivariate analysis with logistic regression were performed to assess concomitant influence of several factors on mobilization efficacy in studied population and to create the probability model of the effective mobilization.

On the base of *in vitro* and *in vivo* results in Balb/c mice it seems that the optimal dose of G-CSF is 500 µg/kg. In DBA mice the dose of 25 µg/kg produced increase of hematopoietic cells count without further increase with WBC caused by rising G-CSF. In

mice C57BL/6 the WBC increase was observed with the G-CSF dose, but the hematopoietic cells count increased only to the dose enclosed between 100 and 500 µg/kg. The CBA mice did not increase the WBC with the G-CSF dose, still the hematopoietic cells count increase was observed, but it was impossible to determine the optimal G-CSF dose. As the result of syngenic transplantation in Balb/c mice the optimal dose of 500 µg/kg was confirmed. In CBA mice higher WBC and faster engraftment after transplantation was observed with cells stimulated by 1000 µg/kg.

In the clinical part of the study in the univariate analysis no influence of the following factors on the mobilization efficacy: G-CSF dose, way of mobilization (G-CSF vs G-CSF + chemotherapy), type of disease (hematological vs solid tumors) and time from diagnosis to mobilization was observed. The possibility of minimal PBSC yield was statistically higher in boys ( $p=0,031$ ). In multivariate analysis the influence on the mobilization efficacy of G-CSF dose was not observed. The time from diagnosis to mobilization and a type of disease (hematological vs solid tumors) were statistically significant factors and influence of sex was observed as a tendency. In the observed group the mobilization was ineffective in 15%.

In summary it seems that in studied mouse strains the optimal doses of G-CSF exist. Different patterns of mobilization between different mouse strains were observed. It could confirm the individual mobilization and susceptibility to G-CSF administration in particular patient. In similar way poor mobilization in certain individuals can be explained. In retrospective analysis in patients the time from diagnosis to mobilization with the type of disease influenced mobilization efficacy. It seems to be connected with the number of chemotherapy cycles preceding the mobilization. The patients who received more treatment mobilised worse. It was also observed that in certain patients the mobilization with G-CSF fails. It confirms that new protocols of mobilization of PBSC are needed.

## 10. LITERATURA

1. Abrams RA, McCormack K, Bowles C, Deisseroth AB. Cyclophosphamide treatment expands the circulating haemopoietic stem cell pool in *dogs*. J Clin Invest 1981; 67:1392-1399.
2. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. Blood 2003;102:1249-1253.
3. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 2000; 404: 193-197.
4. Anderlini P, Rizzo JD, Nugent ML i wsp. Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the international bone marrow transplant registry (IBMR) and European Group for blood and marrow transplant (EBMT) databases. Bone Marrow Transplantation 2001; 27: 689-692.
5. Anderlini P, Przepiorka D, Lauppe J, i wsp. Collection of peripheral blood stem cells from normal donors 60 years of age or older. Br J Haematol 1997; 97:485.
6. Awan F, Kochuparambil ST, Falconer DE, I wsp.: Comparable efficacy and lower cost of PBSC mobilization with intermediate-dose cyclophosphamide and G-CSF compared with plerixafor and G-CSF in patients with multiple myeloma treated with novel therapies. Bone Marrow Transplantation 2013; doi:10.1038/bmt.2013.52.
7. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Dev Comp Immunol 2004;28:509-55
8. Bensinger WI, DiPersio JF, McCarty JM Improving stem cell mobilization strategies: future directions. Bone Marrow Transplant 2009; 43: 181-195
9. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B I wsp. Transplantation of Bone Marrow as Compared with Peripheral-Blood Cells from HLA-Identical Relatives in Patients with Hematologic Cancers. N Engl J Med 2001; 344:175-181
10. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, i wsp. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an

analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br J Haematol* 1994; 87:825.

11. Brown RA, Adkins D, Goodnough LT, Haug JS, Todd G, Wehde M i wsp. Factors that influence the collection and the engraftment of allogenic peripheral blood stem cells in patients with hematological malignancies. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3067–3074.
12. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL (2006). Hematopoietic Stem Cells. *Am Jour of Path*; Vol. 169, No. 2.
13. Brylińska J, Kwiatkowska J (1996). *Zwierzęta Laboratoryjne – Metody Hodowli i Doświadczeń*. Wyd. Universitas.
14. Cashen AF, Link D, Devine S, DiPersio J. Cytokines and stem cell mobilization for autologous and allogeneic transplantation. *Curr Hematol Rep* 2004; 3: 406–412.
15. Cashen AF, Lazrus HM and Devine SM. Mobilizing stem cells from normal donors: it is possible to improve upon G-CSF. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 39: 577-588.
16. Cesaro S, Zanazzo AG, Frenos S, Luksch R, Pegoraro A, Tridello G, Dallorso S. A Phase II study on the safety and efficacy of a single dose of pegfilgrastim for mobilization and transplantation of autologous hematopoietic stem cells in pediatric oncohematology patients. *Transfusion*. 2011 Nov;51(11):2480-7. Epub 2011 May 4.
17. Chabannon C, Le Corroller AG, Viret F i wsp. Cost-effectiveness of repeated aphereses in poor mobilizers undergoing high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2003; 17: 811–813.
18. Clark OAC, Lyman GH, Castro AA i wsp. Colony-stimulating factors for chemotherapy-induced febrile neutropenia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2005; 23 (18): 4198-4214.
19. Clark RE, Brammer CG. Previous treatment predicts the efficiency of blood progenitor cell mobilization: validation of a chemotherapy scoring system. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 859–863.
20. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I i wsp. Stem cell Mobilization. *Hematology* 2003
21. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, i wsp. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; 100:1525.

22. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, i wsp. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* 1997; 90: 4779–4788.
23. Demirer T, Ayui M, Ozcan M i wsp. Mobilization of peripheral blood stem cells with chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): a randomized evaluation of different doses of rhG-CSF. *Br J Haematol* 2002; 116: 468-474.
24. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH i wsp. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1095–1102.
25. Diaz MA, Sevilla J, de la Rubia J i wsp. Factors predicting peripheral blood progenitor cell collection from pediatric donors for allogeneic transplantation. *Haematologica* 2003 Aug 88: 919-922.
26. Duarte RF, Shaw BE, Marín P, Kottaridis P i wsp. Plerixafor plus granulocyte CSF can mobilize hematopoietic stem cells from multiple myeloma and lymphoma patients failing previous mobilization attempts: EU compassionate use data. *Bone Marrow Transplant*. 2011 46, 52–58; doi:10.1038/bmt.2010.54; published online 22 March 2010
27. Egan K, Singh V, Gidron A, Mehta J. Correlation between serum lactate dehydrogenase and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 931-934.
28. Engelhardt M, Bertz H, Afting M i wsp. High- versus standard-dose filgrastim (rhG-CSF) for mobilization of peripheral-blood progenitor cells from allogeneic donors CD34+ immunoselection. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2160-2172
29. De Fabritiis P, Iori AP, Mengarelli A i wsp. CD34+ cell mobilization for allogeneic progenitor cell transplantation: efficacy of a short course of G-CSF. *Transfusion* 2001; 41:190.
30. Fagioli F, Biasin E, Mereuta OM i wsp. Poor prognosis osteosarcoma: new therapeutic approach. *Bone Marrow Transplantation* 2008 41, 131–134
31. Flomenberg N, Devine SM, DiPersio JF I wsp. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 2005; 106: 1867–1874.

32. Ford CD, Green W, Warensky S, Petersen FB. Effect of prior chemotherapy on hematopoietic stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 901-905.
33. Ford CD, Lehman C, Strupp A, Kelly L. Comparison of Cd34+ cell collection on the COBE spectra and Fenwal CS-3000 Plus. *J Clin Apheresis* 2002, 17, 17-20
34. Ford C, Chan K, Reilly W i wsp. An evaluation of predictive factors for CD34+ cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. *Transfusion* 2003, 43, 622 – 625
35. Gazzit Y, Freytes CO, Callander N i wsp. Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization. *J Hemathother* 1999 Apr;8(2):173-83.
36. Gertz MA. Current status of stem cell mobilization. *Br J Haematol* 2010; 150:647.
37. Gianni AM, Siena S, Bregni M i wsp. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 1989; 2: 580-585.
38. Gidron A, Verma A, Doyle M i wsp. Can the stem cell mobilization technique influence CD34+ cell collection efficiency of leukapheresis procedures in patients with hematologic malignancies? *Bone Marrow Transplant* 2005, 35, 243 – 246
39. Gojo I, Guo C, Sarkodee-Adoo C i wsp. High-dose cyclophosphamide with or without etoposide for mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with multiple myeloma: efficacy and toxicity *Bone Marrow Transplantation* 2004, 34, 69-76
40. Halle P, Kanold J, Raptel C i wsp. Granocyte colony-stimulation factor alone at 20 µg/kg vs 10 µg/kg for peripheral blood stem cell mobilization in children. *Pediatr Transplantation* 2000, 4: 285-288.
41. Hattori K, Heissig B, Tashiro K i wsp. Plasma elevation of stroma cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97: 3354 – 3360
42. Heissig B, Hattori K, Dias S i wsp. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109:625.

43. Hibbin JA, Njoku OS, Matutes E i wsp. Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1984; 57: 495-503.
44. Imamura R, Miyamoto T, Yoshimoto G i wsp. Mobilization of Human Lymphoid Progenitors after Treatment with Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *J. of Imm.* 2005; 175:2647-2654.
45. Jones DL, Wagers AJ (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Molecular Cell Biology* Vol. 9:11-21.
46. Karanth M, Chakrabarti S, Lovell RA, Harvey C i wsp. A randomized study comparing peripheral blood progenitor mobilization using intermediate-dose cyclophosphamide plus lenograstim with lenograstim alone. *Bone Marrow Transplant* 2004, 34, 399 – 403.
47. Kessinger A and Sharp JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2003, 31, 319 – 329
48. Ketterer N, Salles G, Raba M i wsp. High CD34(+) cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91:3148.
49. Kozuka T, Ishimaru F, Furii K i wsp. Plasma stroma cell-derived factor-1 during granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 651- 654
50. Kröger N, Renges H, Krüger W i wsp. 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: 761-765
51. Kröger N, Zeller W, Hassan HT i wsp. Stem cell mobilization with G-CSF alone in breast cancer patients higher progenitor cell yield by delivering doses (2x 5 ug/kg) compared to a single dose (1 x 10 ug/kg). *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 125-129.
52. Kuittinen T, Nousiainen T, Halonen P, Mahlamaki i wsp. Prediction of mobilization failure in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33, 907 – 912
53. Ladenstein R, Pötschger U, Hartman O i wsp. 28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures. *Bone Marrow Transplantation* 2008 41, 118-127

54. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the role of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stroma cells. *Experimental hematology* 2002; 30: 973 – 981
55. Lataillade J, Clay D, Dupuy C i wsp. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 2000; 95: 756 – 768
56. De Lavallade H, Ladaïque P, Lemarié C i wsp. Older age does not influence allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in a donor population of mostly white ethnic origin. *Blood* 2009 113:1868-1869
57. Lefrere F, Zohar S, Ghez D, Delarue R i wsp. The VAD chemotherapy regimen plus a G-CSF dose of 10 lg/kg is as effective and less toxic than high-dose cyclophosphamide plus a G-CSF dose of 5 lg/kg for progenitor cell mobilization: results from a monocentric study of 82 patients. *Bone Marrow Transplant* 2006, 37, 725 – 729
58. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ (2003). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111:187–196.
59. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E I wsp. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 2003; 102: 2728–2730.
60. Löwenberg B. Proliferative activity of rG-CSFs in cell line bioassays. *Int J Hematol* 1996; 63, (Suppl 2): 13-14.
61. Madero L, Vicent MG, Sevilla J i wsp. Engraftment syndrome in children undergoing autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(6):355-8
62. Makita K, Ohta K, Mugitani A i wsp. Acute myelogenous leukemia in a donor after granulocyte colony-stimulation factor-primed peripheral blood stem cell harvest. *Bone Marrow Tansplant* 2004; 33: 661-665.
63. Marmont AM. Stem cell transplantation for severe autoimmune diseases: progress and problems *Haematologica*1998; 83:733-743
64. Metcalf D (July 1985). "The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors". *Science* 1985; 229 (4708): 16–22



65. Micallef IN, Apostolidis J, Rohatiner AZ i wsp. Factors which predict unsuccessful mobilisation of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma *Hematol J* 2000; 1: 367–373.
66. Nakamura Y, Tajima F, Ishiga K i wsp. Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice. *Exp Hematol* 2004; 32: 390–396.
67. Negrin RS, Kusnierz-Glaz CR, Still BJ i wsp. Transplantation of enriched and purged peripheral blood progenitor cells from a single apheresis product in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; 85:3334
68. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 2006; 99: 690-705
69. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004; 103:1580
70. Papayannopoulou T. The role of G-protein signaling in hemopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 101: 4739 – 4747
71. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B i wsp. Synergistic mobilization of hematopoietic progenitor cells using concurrent beta1 and beta2 integrin blockade or beta2-deficient mice. *Blood* 2001; 97: 1282–1288.
72. Papayannopoulou T. Mechanism of stem cell-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Semin Hematol* 2000; 37: 11-18
73. Passweg JR, Baldomero H, Bregni M I wsp. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Apr 15, 1-7
74. Pastore D, Specchia G, Mestice A i wsp. Good and poor CD34+ cells mobilization in acute leukemia: analysis of factors affecting the progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33; 1083 – 1087
75. Pavone V, Gaudio F, Console G i wsp. Stem Cell Procurement. Poor mobilization is an independent prognostic factor in patients with malignant lymphomas treated by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37: 719–724.
76. Pecora AL. Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (Suppl 2): S7–S12

77. Pelus LM, Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia* 2008; 22:466.
78. Pérez-Dueñas B, Alcorta I, Estella J i wsp. Safety and efficacy of high-dose G-CSF (24 µg /kg) alone for PBSC mobilization in children. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 30, 987-988.
79. Perry AR, Watts MJ, Peniket AH i wsp. Progenitor cell yields are frequently poor in patients with histologically indolent lymphomas especially when mobilized within 6 months of previous chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1201–1205.
80. Pession A, Rondelli R, Paolucci P i wsp. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood: report from the bone marrow transplantation group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP). *Haematologica* 2000; 85:638-646
81. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A i wsp. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and upregulation CXCR4. *Nature Immunology* 2002;3:7, 687 – 694
82. Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-Trans Retinoic Acid Delays the Differentiation of Primitive Hematopoietic Precursors (lin-c-kit+Sca-1+) While Enhancing the Terminal Maturation of Committed Granulocyte/Monocyte Progenitors. *Blood* 1994, 483-495.
83. Pusic I, Jiang SY, Landua S i wsp. Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Sep; 14(9):1045-56.
84. Rabusin M, Andolina M, Maximova N. Haematopoietic SCT in autoimmune diseases in children: rationale and new perspectives. *Bone Marrow Transplantation* (2008) 41, 96–99
85. Reddy RL (2005). Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation; *Transfusion and Apheresis Science.* 32:63–72.
86. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47:1031–1039.
87. Ringdén O, Barrett AJ, Zhang MJ i wsp. Decreased treatment failure in recipients of HLA-identical bone marrow or peripheral blood stem cell transplants with high CD34 cell doses. *Br J Haematol* 2003; 121:874

88. De La Rubia J, Díaz MA, Verdeguer A i wsp. Donor age-related differences in PBPC mobilization with rHuG-CSF. *Transfusion* 2001; 41:201.
89. De La Rubia J, Cristina Arbona, Felipe De Arriba i wsp. Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors. *Transfusion* 2002; 42: 4–9.
90. Sartor MM, Garvin F, Antonenas V, i wsp. Failure to achieve a threshold dose of CD34+CD110+ progenitor cells in the graft predicts delayed platelet engraftment after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007, 40, 851 - 857.
91. Saunders G. G-CSFs in daily pharmaceutical practice. *Aten Farm* 2001; 3: 266-270.
92. Sevilla J, González-Vicent M, Madero L, i wsp. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 µg/kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation* 2002 30, 417-420
93. Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, i wsp. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2006; 108:4288.
94. Schöler HR (2007). *The Potential of Stem Cells*. Ashgate Publishing 28
95. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 106:3020–3027.
96. Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH i wsp. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2006; 24 (19): 3187-3205.
97. Socinski M, Cannistra S, Elias A i wsp. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cells compartment in man. *Lancet* 1988; 1: 1194-1198.
98. Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP i wsp. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow – derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood* 2002; 99: 2037-2044

99. Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. *Bone Marrow Transplant*. 1999 May; 23 Suppl 2: S29-33.
100. Sugrue MW, Williams K, Pollock BH i wsp. Characterization and outcome of "hard to mobilize" lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2000 Nov; 39(5-6): 509-19.
101. Talarn C, Urbano-Ispizua A, Martino R i wsp. G-CSF increases the number of peripheral blood dendritic cells CD16+ and modifies the expression of the costimulatory molecule CD86+. *Bone Marrow Transplant* 2006, 37, 873 - 879
102. Tassi C, Tazari PL, Bonifazi F i wsp. Short- and long-term haematological surveillance of healthy donors of allogenic peripheral haematopoietic progenitors mobilized with G-CSF: a single institution prospective study. *Bone Marrow Tansplant* 2005; 36: 289-294.
103. To LB, Haylock DN, Simmons PJ i wsp. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89: 2233-2258.
104. Tomblyn M, Burns LJ, Blazar B i wsp. Difficult stem cell mobilization despite adequate Cd34+ cell dose predicts shortened progression free and overall survival after autologous HSCT for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2007, 40, 111 - 118.
105. Tricot G, Morris CL, Siegel E i wsp. Peripheral blood stem cell mobilization in elderly ( $\geq 70$  years) versus younger patients: A study of 984 multiple myeloma patients [abstract]. *Proc ASCO* 2002; 21:264a.
106. Tricot G, Jagannath S, Vesole D i wsp. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood* 1995; 85:588
107. Wachowiak J, Labopin M, Miano M i wsp. Haematopoietic stem cell transplantation in children in eastern European countries 1985–2004: development, recent activity and role of the EBMT/ESH Outreach Programme. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41: 112–117
108. Wachowiak J. Wskazania do transplantacji komórek krwiotwórczych w onkologii i hematologii dziecięcej w 2003 roku. *Przegląd Lekarski* 2003; 60 (Suplement 5): 35-40.

109. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:387-403.
110. Weaver CH, Birch R, Greco FA i wsp. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Haematol.* 1998; 100(2):338-347.
111. Welte K, Platzer E, Lu L i wsp. Purification and biochemical characterization of human pluripotency hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 85: 1526-1530.
112. Winkler IG, Levesque JP. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol* 2006; 34: 996–1009
113. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP i wsp. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001; 294: 1933–1936.
114. Wuchter P, Ran D, Bruckner T i wsp. Poor Mobilization of Hematopoietic Stem Cells – Definitions, Incidence, Risk Factors and Impact on Outcome of Autologous Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2010;16:490–499
115. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1404.
116. Zhang C, Chen X, Zhang X i wsp. Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous transplantation patients with hematological malignancies: Influence of disease, mobilization method, age and sex. *Transfus Apher Sci.* 2008 Aug;39(1):21-8.

## 11. SPIS TABEL

Tabela 3.1	Charakterystyka pacjentów.....	27
Tabela 3.2.	Schematy pierwszego cyklu mobilizacji.....	28
Tabela 3.3.	Charakterystyka pacjentów i schemat drugiego cyklu mobilizacji.....	28
Tabela 4.1.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 1.....	35
Tabela 4.2.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 2.....	35
Tabela 4.3.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 3.....	36
Tabela 4.4.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu DBA - doświadczenie 1.....	41
Tabela 4.5.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu DBA - doświadczenie 2.....	41
Tabela 4.6.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu C57 - doświadczenie 1.....	46
Tabela 4.7.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu C57 - doświadczenie 2.....	47
Tabela 4.8	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu CBA - doświadczenie 1.....	52
Tabela 4.9.	Ocena zdolności mobilizowanych komórek hematopoetycznych do proliferacji w warunkach <i>in vitro</i> w zależności od wielkości dawki G – CSF u myszy szczepu CBA - doświadczenie 2.....	52
Tabela 4.10.	Średnia ilość kolonii śledzionowych w +11 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr1.....	54

Tabela 4.11.	Średnia ilość kolonii śledzionowych w +11 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr 2.....	56
Tabela 5.1.	Modele prawdopodobieństwa w modelowaniu 1. ....	74
Tabela 5.2	Modele prawdopodobieństwa w modelowaniu 2. ....	78

## 12. SPIS RYSUNKÓW I WYKRESÓW

Rysunek 4.1. Kolonie śledzionowe w +11 po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu Balb/c – doświadczenie nr 1.....	56
Wykres 4.1. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 1).....	30
Wykres 4.2. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 2).....	31
Wykres 4.3. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G-CSF u myszy szczepu Balb/c w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 3).....	32
Wykres 4.4 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 1).....	32
Wykres 4.5 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 2).....	33
Wykres 4.6 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy Balb/c (doświadczenie 3).....	34
Wykres 4.7. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G - CSF u myszy szczepu DBA w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 1).....	38
Wykres 4.8. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G - CSF u myszy szczepu DBA w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 2).....	39
Wykres 4.9. Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy DBA (doświadczenie 1).....	39
Wykres 4.10 Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy DBA (doświadczenie 2).....	40
Wykres 4.11. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G – CSF u myszy szczepu C57BL/6 w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 1).....	42
Wykres 4.12. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G – CSF u myszy szczepu C57 w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 2).....	44
Wykres 4.13. Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy C57 (doświadczenie 1).....	45
Wykres 4.14. Liczba komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G – CSF u myszy C57 (doświadczenie 2).....	45
Wykres 4.15. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G – CSF u myszy szczepu CBA w zależności od wielkości dawki G – CSF (doświadczenie 1).....	48



Wykres 4.16. Leukocytoza w krwi obwodowej w piątym dniu mobilizacji G - CSF u myszy szczepu CBA w zależności od wielkości dawki G - CSF (doświadczenie 2).....	49
Wykres 4.17. Liczba macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G - CSF u myszy CBA (doświadczenie 1).....	50
Wykres 4.18. Liczba macierzystych komórek krwiotwórczych w mobilizowanej krwi obwodowej w zależności od dawki G - CSF u myszy CBA (doświadczenie 2).....	51
Wykres 4.19. Średnia leukocytoza w 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 1.....	53
Wykres 4.20. Średnia leukocytoza w 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu Balb/c - doświadczenie 2.....	54
Wykres 4.21. Średnia leukocytoza w 4 i 7 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu CBA - doświadczenie 1.....	57
Wykres 4.22. Średnia leukocytoza w 4, 7 i 10 dniu po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF u myszy szczepu CBA - doświadczenie 2.....	58
Wykres 5.1. Liczba zebranych komórek w kolejnych separacjach.....	60
Wykres 5.2. Możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji. ....	61
Wykres 5.3. Możliwość uzyskania minimalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji w zależności od rodzaju mobilizacji. ....	62
Wykres 5.4. Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji.....	63
Wykres 5.5 Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku kolejnych separacji w zależności od rodzaju mobilizacji.....	63
Wykres 5.8. Skuteczność mobilizacji w zależności od dawki G - CSF. 0 - mobilizacja nieskuteczna, 1 - mobilizacja skuteczna. Histogram przedstawia rozkład pacjentów mobilizowanych różnymi dawkami G - CSF.....	65
Wykres 5.9. Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek CD34+ w wyniku mobilizacji w zależności od dawki G - CSF.....	66
Wykres 5.10. Skuteczność mobilizacji w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji. ....	67
Wykres 5.11. Możliwość uzyskania optymalnej liczby komórek CD34+ w wyniku mobilizacji w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji. 0 - brak optymalnej liczby CD34+, 1 - uzyskano optymalną liczbę CD34+. Czas przedstawiono w miesiącach.....	68
Wykres 5.12. Skuteczność mobilizacji w zależności od płci.....	69

Wykres 5.13. Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od płci. ....	69
Wykres 5.14. Skuteczność mobilizacji w zależności rodzaju rozpoznania.....	70
Wykres 5.15. Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od rodzaju rozpoznania.....	71
Wykres 5.16. Skuteczność mobilizacji w zależności od rodzaju mobilizacji. ....	72
Wykres 5.17. Uzyskanie optymalnej liczby komórek krwiotwórczych w wyniku mobilizacji w zależności od rodzaju mobilizacji.....	72
Wykres 5.18. Prawdopodobieństwo uzyskania min $2 \times 10^6$ /kg m.c. komórek krwiotwórczych (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania.....	75
Wykres 5.19. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. komórek krwiotwórczych (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania.....	76
Wykres 5.20. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. komórek krwiotwórczych w trakcie jednej separacji (stopień 3. w skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji w różnych grupach rozpoznania.....	77
Wykres 5.21. Prawdopodobieństwo uzyskania min $2 \times 10^6$ /kg m.c. (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.....	78
Wykres 5.22. Prawdopodobieństwo uzyskania min $2 \times 10^6$ /kg m.c. (stopień 1. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.....	79
Wykres 5.23. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.....	79
Wykres 5.24. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. (stopień 2. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.....	80
Wykres 5.25. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. w trakcie jednej aferezy (stopień 3. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie nowotworów hematologicznych.....	81
Wykres 5.26. Prawdopodobieństwo uzyskania min $3 \times 10^6$ /kg m.c. w trakcie jednej aferezy (stopień 3. w przyjętej skali skuteczności) w zależności od czasu od rozpoznania do mobilizacji u chłopców i dziewcząt w grupie guzów litych.....	81