Клиническая онкогематология. 2018;11(4):368–77

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА

Корреляция гемопоэтических стволовых клеток CD34+ и колониеобразующих единиц в продуктах афереза периферической крови у пациентов со злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями до и после криоконсервирования перед аутоТГСК

В.А. Балашова, В.И. Ругаль, С.С. Бессмельцев, С.В. Грицаев, Н.Ю. Семенова, С.В. Волошин, Ж.В. Чубукина, А.В. Шмидт, А.Д. Гарифуллин, И.М. Запреева, А.А. Кузяева, И.И. Кострома, А.Ю. Кувшинов, А.В. Чечеткин

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

РЕФЕРАТ

Цель. Определить корреляцию между числом аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) CD34+ и колониеобразующих единиц (КОЕ) в одних и тех же образцах продукта афереза периферической крови до и после криоконсервирования у больных множественной миеломой и лимфомами; оценить клиническую значимость этих показателей.

Материалы и методы. Изучены образцы клеток цитаферезного продукта периферической крови и клеточные культуры до и после криоконсервирования у 32 больных множественной миеломой и 25 больных лимфомами, которым была выполнена трансплантация аутологичных ГСК. В работе с материалом использовались культуральные методы и метод проточной цитометрии.

Результаты. Представлены данные о зависимости числа CD34+ ГСК, полученных с помощью проточной цитометрии, и КОЕ в культуре клеток, полученных путем цитафереза одного и того же образца периферической крови. Обнаружена прямая связь между числом клеток CD34+ и всех КОЕ до и после криоконсервирования у больных лимфомами. Выявлена корреляция числа клеток CD34+ и гранулоцитарно-макрофагальных КОЕ до криоконсервирования у больных множественной миеломой и лимфомами.

Заключение. Показатель колониеобразующей способности клеток, используемый для учета функционально-активных ГСК, является не менее надежным критерием оценки состояния пролиферативного пула аутотрансплантата, чем клетки CD34+. Для оценки количественного и качественного состояния аутотрансплантата больных множественной миеломой и лимфомами необходимо применять оба метода исследования.

Clinical oncohematology. 2018;11(4):368–77

ONCO clinical HEMATOLOGY

BONE MARROW TRANSPLANTATION

Correlation of CD34+ Hematopoietic Stem Cells and CFU in Peripheral Blood Apheresis Products in Patients with Malignant Lymphoproliferative Diseases Before and After Cryopreservation Prior to auto-HSCT

VA Balashova, VI Rugal', SS Bessmeltsev, SV Gritsaev, NYu Semenova, SV Voloshin, ZhV Chubukina, AV Shmidt, AD Garifullin, IM Zapreeva, AA Kuzyaeva, II Kostroma, AYu Kuvshinov, AV Chechetkin

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

ABSTRACT

Aim. To establish correlation between CD34+ autologous hematopoietic stem cell (HSC) count and colony-forming units (CFU) in the same peripheral blood apheresis product samples before and after cryopreservation in multiple myeloma and lymphoma patients, and to assess clinical value of these parameters.

Materials & Methods. Cell samples of peripheral blood cytapheresis product and cell cultures were studied before and after cryopreservation in 32 multiple myeloma and 25 lymphoma patients who underwent autologous HSC transplantation. The material was analyzed using culture technique and flow cytometry.

Results. The paper provides information on the relationship between CD34+ HSC count obtained by flow cytometry, and CFU in cell culture obtained by cytapheresis of the same peripheral blood samples. A direct correlation was confirmed between CD34+ count and all the CFUs before and after cryopreservation in lymphoma patients. Correlation between CD34+ count and granulocyte-macrophage CFUs was revealed in multiple myeloma and lymphoma patients before cryopreservation.

Conclusion. The parameter of colony-forming capacity used for the assessment of the functional HSC was shown to be equally reliable criterion for condition evaluation of autotransplant proliferative pool than CD34+ cells. Both methods should be applied for qualitative and quantitative evaluation of an autotransplant for multiple myeloma and lymphoma patients.

© 2018 практическая медицина

Ключевые слова: клетки CD34+, КОЕ, КОЕ-ГМ, корреляция, лимфома, множественная миелома, аферез, аутоТГСК.

Keywords: CD34+ cells, CFU, CFU-GM, correlation, lymphoma, multiple myeloma, apheresis, auto-HSCT.

Получено: 11 апреля 2018 г.
Принято в печать: 28 июля 2018 г.

Received: April 11, 2018
Accepted: July 28, 2018

Для переписки: Валентина Андреевна Балашова, канд. мед. наук, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; тел.: +7(812)717-19-37; e-mail: vbspb37@mail.ru

For correspondence: Valentina Andreevna Balashova, MD, PhD, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; Tel.: +7(812)717-19-37; e-mail: vbspb37@mail.ru

Для цитирования: Балашова В.А., Ругаль В.И., Бессмельцев С.С. и др. Корреляция гемопоэтических стволовых клеток CD34+ и колониеобразующих единиц в продуктах афереза периферической крови у пациентов со злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями до и после криоконсервирования перед аутоТГСК. Клиническая онкогематология. 2018;11(4):368–77.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-368-377

For citation: Balashova VA, Rugal' VI, Bessmeltsev SS, et al. Correlation of CD34+ Hematopoietic Stem Cells and CFU in Peripheral Blood Apheresis Products in Patients with Malignant Lymphoproliferative Diseases Before and After Cryopreservation Prior to auto-HSCT. Clinical oncohematology. 2018;11(4):368–77.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-368-377

ВВЕДЕНИЕ

В лечении больных множественной миеломой (ММ) и лимфомами широко применяется высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Периферическая кровь, обогащенная мобилизованными из костного мозга ГСК, является их основным источником. После мобилизации периферическая кровь подвергается аппаратному аферезу. Продукт афереза — это клеточная взвесь, в которой большая часть принадлежит мононуклеарным клеткам, среди которых находятся ГСК. Успех трансплантации зависит от эффективности мобилизации, количества, качества и функциональной активности ГСК. Эта популяция клеток, способная восстанавливать угнетенный гемопоэз и репопулировать костный мозг после агрессивной химиотерапии, неоднородна. В ее состав входят:

1) гемопоэтические стволовые плюрипотентные клетки (их называют также истинными, ранними или примитивными ГСК);
2) гемопоэтические стволовые мультипотентные коммитированные клетки (родоначальные);
3) гемопоэтические прогениторные коммитированные клетки (ГПК);
4) клетки-предшественницы кроветворных клеточных линий — прекурсорные клетки.

Этим клеткам соответствуют различные уровни дифференцировки и созревания, поэтому их потенциал в процессе кроветворения неодинаков. Доля самых ранних ГСК в организме очень мала — 0,05–0,1 % всех гемопоэтических клеток костного мозга. Они лишены линейных маркеров (Lin), экспрессируют стволовые клеточные антигены SCA-1, рецептор c-kit (CD90), C-135 и способны к самовозобновлению [1–3]. Большинство примитивных ГСК человека экспрессирует также поверхностный антиген CD34 и CD34 с коэкспрессией CD45RA, но не CD38. Большая часть этих клеток находится в эндостальных нишах костного мозга в состоянии покоя.

Клетки второго уровня мультипотентны, но их способность к самоподдержанию ограничена, и они коммитированы, т. е. уже получили импульс к дифференцировке.

Клетки третьего уровня — ГПК — уже не называют стволовыми. Это потомки истинных ГСК, и их доля среди всех репопулирующих гемопоэтических клеток велика — около 90 % [2]. У гематологических больных содержание ГСК и ГПК в полученной благодаря мобилизации из костного мозга и аферезу клеточной взвеси зависит в каждом случае от многих причин, среди которых возраст пациента, характер и интенсивность предшествующей трансплантации терапии, число лечебных циклов, особенности режимов мобилизации и заготовки клеток. Известно, что значительная часть пациентов с ММ и лимфомами (около 30 %) характеризуется плохой мобилизацией клеток и им требуется повторная мобилизация. У больных ММ и лимфомами при рецидивах или резистентном течении болезни повторной мобилизации предшествует вторая линия предтрансплантационной терапии, а именно ВДХТ с последующей трансплантацией аутологичных ГСК (аутоТГСК), так называемая терапия спасения [4, 5]. Успехи данного вида терапии сделали ее на определенном этапе средством выбора у этой категории больных. Однако существует реальная опасность развития рефрактерности, обусловленной, в частности, как изначальной геномной нестабильностью и клональной гетерогенностью, так и влиянием агрессивной ВДХТ, приводящей к появлению новых химиорезистентных клонов [6, 7]. В таких ситуациях может возникнуть вопрос о необходимости выполнения аллогенной трансплантации.

Для успеха трансплантации имеет значение состояние костномозговых ниш, подвергающихся токсическому воздействию агрессивной химиотерапии, выраженность хоуминга и заякоривания перелитых клеток в нишах, тип активации регулирующих цитокинов [8–11]. Все эти клетки, как ранние «истинные» ГСК, так и более зрелые ГПК, являются CD34-экспрессирующими. Антиген CD34 считается маркером ГСК и ГПК, и количество клеток CD34+ в значительной степени определяет пригодность трансплантата. От дозы перелитых клеток CD34+ зависит

успех трансплантации, а именно срок восстановления гемопоэза. Трансплантация аутологичных клеток периферической крови, обогащенной фракцией ГСК, способствует сокращению периода цитопении и восстановлению гемопоэза после интенсивной ВДХТ [12–15].

Однако следует принимать во внимание, что популяция клеток CD34+ неоднородна и включает субпопуляции, обусловленные дифференциальной экспрессией других антигенов. Большинство гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ) находится в субпопуляции CD34-экспрессирующих клеток с коэкспрессией антигена CD45RA [16–18]. Более перспективным для идентификации ГСК считается антиген CD133, который появляется на клеточной мембране на самых ранних этапах созревания.

В то же время успех трансплантации зависит не только от количества перелитых клеток CD34+, но и от их функциональной активности. Показателем этой активности является способность CD34-экспрессирующих клеток формировать колонии клеток *in vitro*. В клинической практике определение колониеобразующей способности клеток наряду с клетками CD34+ нашло широкое применение. Изучение колониеобразующей способности клеток, т. е. числа КОЕ в единице объема исследуемого материала, позволяет определять потенциал кроветворного пула костного мозга, периферической или пуповинной крови либо трансплантата. На основе краткосрочной 14-дневной культуры клеток существует возможность изучать ГПК, находящиеся между «истинными» ГСК и полностью коммитированными прекурсорными клетками [19]. Число КОЕ (в частности, КОЕ-ГМ и бурстобразующих единиц эритроидного ряда — БОЕ-Э) в трансплантате указывает на количество репопулирующих клеток, способных восстанавливать гемопоэз. Мультипотентным ГСК свойственно как симметричное, так и асимметричное деление, в результате которого одна дочерняя клетка остается той же ГСК, что обеспечивает самоподдержание этого пула и сохранение его уровня в костном мозге. Вторая дочерняя клетка подвергается коммитированию, т. е. делает выбор в направлении линейной дифференцировки, показывая различные комбинации дифференцировочного потенциала [20]. Очевидно, что линейное коммитирование, происходящее на уровне ГСК, ответственно за снижение функциональной активности стволовых клеток.

Клонирование кроветворных клеток *ex vivo* открыло новые возможности для понимания процессов кроветворения. Благодаря этому удалось доказать клональный характер ГСК, т. е. происхождение клона однотипных клеток из одной ГСК. Способные к пролиферации стволовые клетки CD34+ образуют в культуральных средах дискретные клеточные колонии: гранулоцитарные (КОЕ-Г), эритроидные (БОЕ-Э), макрофагальные (КОЕ-М), гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ), смешанные — гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные и мегакариоцитарные (КОЕ-ГЭММ), анализ которых позволяет оценивать колониеобразующую способность ГСК (рис. 1).

Изучение КОЕ из бластных колоний подтверждает стохастическую модель поведения ГСК под влиянием цитокинов, т. е. случайный выбор ими направления дифференцировки. Образующиеся в результате коммитирования клетки-потомки — ГПК CD34+ — при пересадке обеспечивают быстрое, но кратковременное приживление трансплантата и репопуляцию, т. е. восстановление гемопоэза, пострадавшего от агрессивной химиотерапии или облучения [21, 22]. Наибольшее значение имеет количество колоний КОЕ-ГМ, т. к. именно они обеспечивают быстрое восстановление гранулоцитарного ростка.

В то же время ГСК, заселяющие в результате хоуминга костномозговые ниши, обеспечивают долговременное приживление трансплантата. Оно происходит позднее и характеризует ГСК и их функцию. Время «переключения» кратковременного приживления на долговременное зависит от качества трансплантата, инфильтрации костного мозга опухолевыми клетками, предтрансплантационной подготовки и других причин. Поскольку CD34-экспрессирующие клетки включают как ранние стволовые клетки ГСК, так и их потомки ГПК, их число должно прямо коррелировать с кратковременной и долговременной кинетикой репопуляции, отражая тактику и стратегию поведения всех участвующих в этом процессе клеток. Чем больше будет у пациента, проходящего миелоаблативную терапию, клеток CD34+ в трансплантате, тем быстрее произойдет восстановление нейтрофилов и тромбоцитов. Если имеет место быстрое их восстановление в первые недели, вызванное функцией ГПК CD34+, то можно ожидать хорошей клинической реакции в долгосрочной перспективе, т. к. пациент сможет преодолеть критический период после миелоаблативного курса лечения [21, 22].

Цель настоящего исследования — определить корреляцию между числом клеток CD34+ и КОЕ в культуре клеток в одних и тех же образцах продукта афереза периферической крови до и после криоконсервирования у больных ММ и лимфомами, чтобы оценить клиническую значимость этих показателей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили клеточная взвесь продукта афереза периферической крови и клеточные культуры 25 больных лимфомами и 32 с ММ.

Учитывая, что все ГПК являются CD34-экспрессирующими клетками и составляют большую часть репопулирующих клеток трансплантата, а клетки CD34+ являются потенциальными КОЕ в культуре, мы сочли возможным для сопоставления результатов оценивать их в одной и той же единице объема — в 100 000 клеток исследуемого аферезного продукта.

Метод мобилизации клеток из костного мозга и метод афереза на сепараторе клеток

Для сбора ГСК после мобилизации крови осуществляли аферезы на сепараторах клеток крови Hemonetics MCS+ и Cobe Spectra (Version 6.1). В процессе каждого афереза обрабатывали 2,5 объема циркулирующей крови. Неудачными считали сборы, когда количество клеток CD34+ в аферезном продукте было менее 2×10^6/кг. В качестве криопротектора был использован

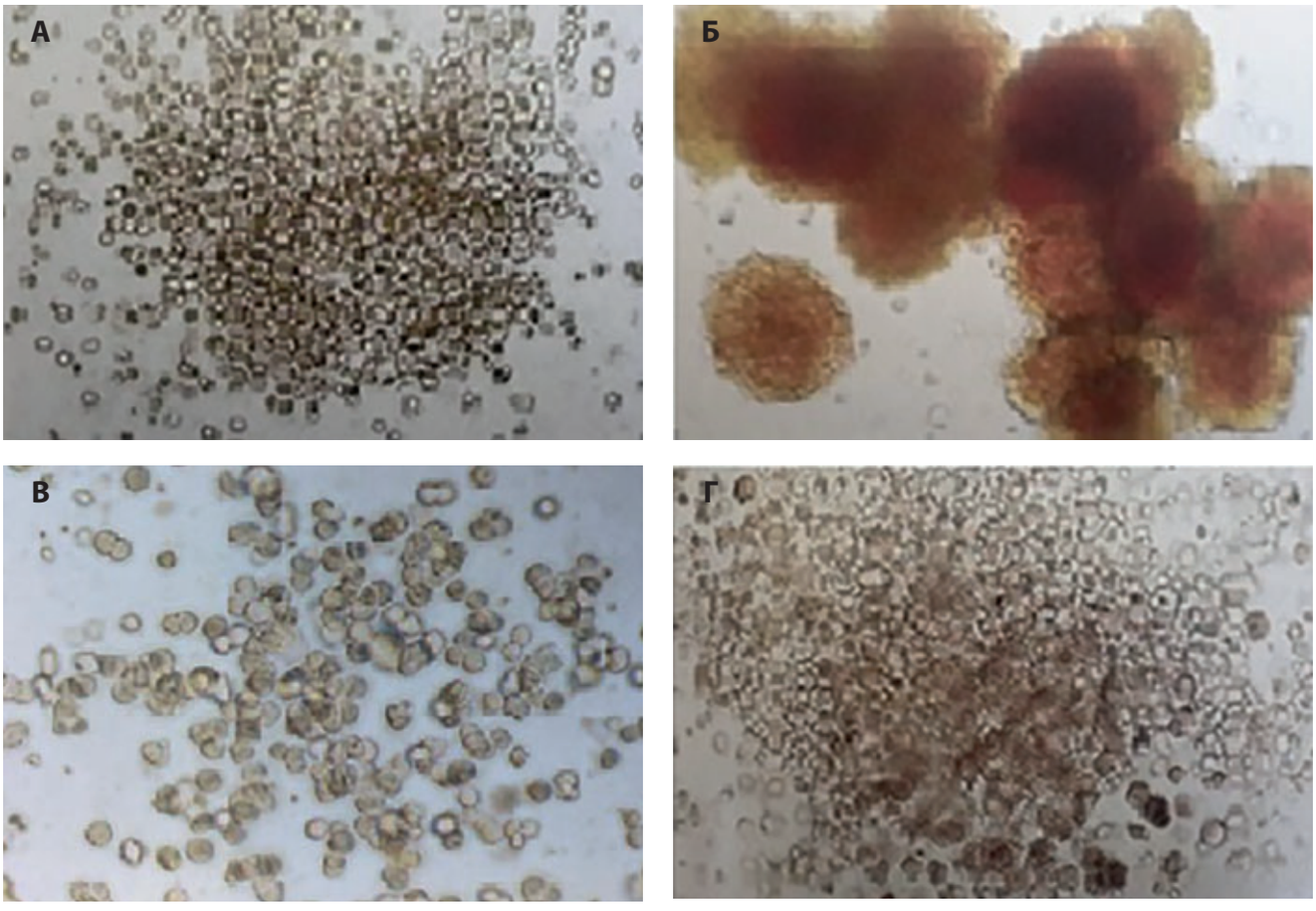

Рис. 1. Клеточные колонии:
А — гранулоцитарная колония, ×100; *Б* — эритроидные колонии, ×100; *В* — макрофагальная колония, ×100; *Г* — гранулоцитарно-макрофагальная колония, ×100

Fig. 1. Cell colonies:
А — granulocyte colony, ×100; *Б* — erythroid colonies, ×100; *В* — macrophage colony, ×100; *Г* — granulocyte-macrophage colony, ×100

20% раствор диметилсульфоксида, приготовленного *ex tempore* с применением аутологичной плазмы. Клеточную взвесь смешивали с криопротектором в соотношении 1:1 (конечная концентрация криопротектора — 10 %) и помещали в одноразовые пластиковые пакеты. Замораживание заготовленных клеток осуществляли в аппарате программного замораживания Cryo 560-16 Planer RLC по 4-этапной схеме: 1-й этап — с –4 до –20 °С со скоростью 1 °С/мин, 2-й этап — с –20 до –40 °С со скоростью 2 °С/мин, 3-й этап — с –40 до –80 °С со скоростью 4 °С/мин, 4-й этап — с –80 до –140 °С со скоростью 20 °С/мин. После этого контейнеры с клеточной взвесью хранили в парах азота при температуре –140 °С. Размораживание взвеси осуществляли на водяной бане при температуре 39 °С.

Метод культивирования клеток в полутвердой культуральной среде MethoCult H4435 на основе метилцеллюлозы

Для культивирования клеток была использована культуральная среда MethoCult H4435 (Stemcell Technologies, Канада) — полная среда на основе метилцеллюлозы. Полученная путем сепарации клеточная взвесь содержит мононуклеары и клетки нейтрофильного ряда. Клетки в количестве 1×10^5 помещали в составе 1 мл полной среды MethoCult H4435 в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм. Чашки Петри размещали в CO_2-инкубаторе во влажной среде при температуре 37 °С. Колониеобразующую способность заготовленных ГСК оценивали по результатам 14-дневного культивирования. ГСК выявлялись по их способности формировать колонии, каждая из которых является клоном от материнской ГСК. Под микроскопом определяли принадлежность колоний к эритроидному или гранулоцитарно-моноцитарному ряду и их качественные характеристики. Подсчет включал эритроидные колонии, образованные БОЕ-Э; гранулоцитарные колонии, сформированные КОЕ-Г; а также макрофагальные, гранулоцито-макрофагальные и смешанные колонии, образованные КОЕ-М, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ соответственно. Полученные данные обрабатывали статистическими методами (критерий Стьюдента, критерий Манна—Уитни при $p < 0,05$) с помощью программ Microsoft Excel и Statistica-6 для Windows.

Метод проточной цитометрии для определения числа клеток CD34+ в продукте афереза мобилизованной периферической крови

Учет ГСК CD34+ осуществлялся в многоцветном анализе с помощью метода лазерной проточной

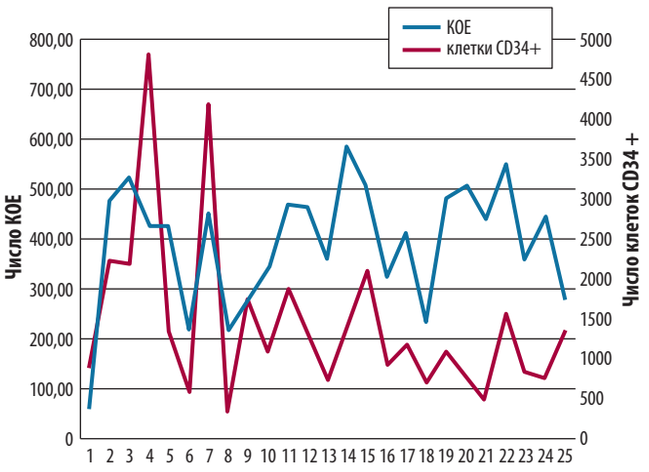

Рис. 2. Взаимосвязь числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных с лимфомами до криоконсервирования

Fig. 2. Correlation between the count of colony-forming units (KOE) and CD34+ cells in the apheresis product in lymphoma patients before cryopreservation

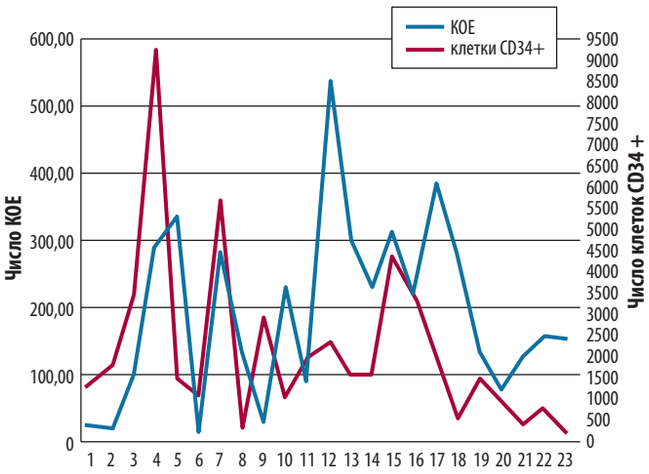

Рис. 3. Взаимосвязь числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных с лимфомами после размораживания

Fig. 3. Correlation between the count of colony-forming units (KOE) and CD34+ cells in the apheresis product in lymphoma patients after defrosting

цитофлюориметрии на проточном лазерном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов Stem-KIT Reagents (Beckman Coulter, США), который включает моноклональные антитела CD45-FITC, CD34-PE, CD45-FITC, ISOCLONIC CONTROL-PE, витальный краситель 7-AAD, суспензию счетных частиц Stem-Count Fluorospheres и лизирующий буфер. Использование CD45-панлейкоцитарного маркера позволяет определять лейкоциты и исключать из рассмотрения тромбоциты и эритроциты. Витальный краситель 7-AAD (7-аминоактиномицин D) проникает в ядра поврежденных (находящихся в позднем апоптозе и некрозе) клеток, что дает возможность исключить их из анализа и тем самым определить жизнеспособность клеточной популяции лейкафереза. Анализ учета клеток CD34+ проводился в модифицированном протоколе ISHAGE. В результате анализа получали абсолютное содержание лейкоцитов в продукте лейкафереза, относительное и абсолютное содержание ГСК CD34+ и определяли их жизнеспособность.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы изучали образцы продукта афереза мобилизованной периферической крови у 57 пациентов с лимфопролиферативными новообразованиями, которым была выполнена аутоТГСК, из них 32 человека с ММ и 25 — с лимфомами.

Лимфомы

У больных лимфомами число CD34-экспрессирующих клеток до криоконсервирования колебалось от 360 до 4800 × 10^5 клеток аферезного продукта, составляя в среднем 1463,28 ± 201,0 × 10^5.

Сопоставление числа клеток CD34+ до и после размораживания аутотрансплантата показало, что у больных лимфомами количество клеток CD34+ в размороженной клеточной взвеси в 1,5 раза превышало исходные (до криоконсервирования) показатели. Число клеток CD34+ колебалось от 362 до 9190 × 10^5, среднее значение 2210,0 ± 415,6 *vs* 1463,28 ± 201,0 исходно (статистически незначимо).

Число всех КОЕ до криоконсервирования колебалось от 67 до 558 × 10^5, в среднем 393,3 ± 25,6 колонии. Таким образом, число клеток CD34+ почти в 4 раза (1:3,7) превышало число КОЕ. Следовательно, только около 25 % клеток CD34+ были способны к колониеобразованию. По данным ряда авторов [23–25], 40–50 % клеток CD34+ аферезного продукта обладали клоногенной способностью. Однако следует принять во внимание, что в этих исследованиях клетки CD34+ были перед культивированием выделены и очищены.

Коэффициент корреляции Спирмена составил в нашем исследовании +0,53, т. е. была выявлена прямая корреляция между количеством клеток CD34+ и числом КОЕ на 1 × 10^5 до криоконсервирования. Зависимость признаков статистически значима ($p < 0,05$).

Показана тенденция к прямой корреляции между этими двумя показателями, т. е. чем больше число клеток CD34+, тем больше колоний на 1 × 10^5 клеток в одном и том же образце аферезного продукта (рис. 2). При этом наблюдались значительные вариации в пропорции CD34-экспрессирующих клеток и КОЕ *in vitro*.

Анализ в световом микроскопе лейкоцитарной формулы в мазках из клеток аферезного продукта у 25 пациентов с лимфомами до криоконсервирования и после размораживания клеток показал увеличение содержания мононуклеарных клеток в 1,2 раза (с 65 до 77,1 %) в размороженной клеточной взвеси, но менее значимое, чем увеличение количества клеток CD34+ (в 1,5 раза). Данные различия статистически незначимы.

Сравнение числа КОЕ и клеток CD34+ в одних и тех же образцах аферезного продукта после размораживания показало значительное (в 1,5 раза) и статистически значимое снижение числа колоний по

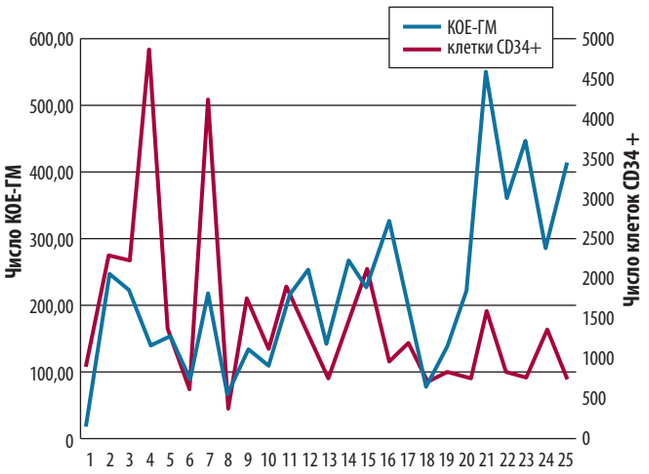

Рис. 4. Взаимосвязь числа гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных с лимфомами до криоконсервирования

Fig. 4. Correlation between the count of granulocyte-macrophage colony-forming units (КОЕ-ГМ) and CD34+ cells in the apheresis product in lymphoma patients before cryopreservation

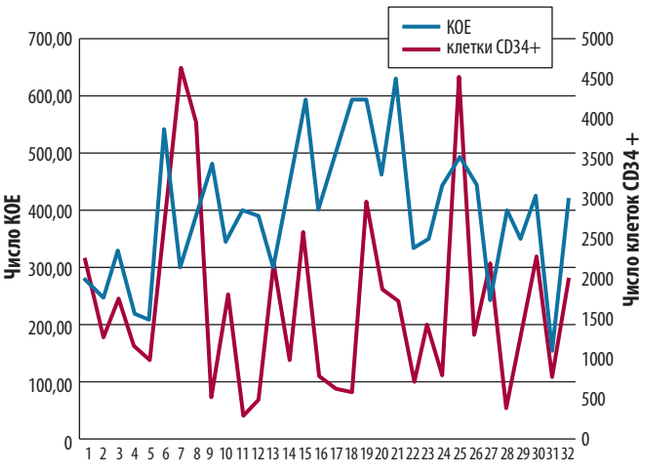

Рис. 5. Взаимосвязь числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных множественной миеломой до криоконсервирования

Fig. 5. Correlation between the count of colony-forming units (КОЕ) and CD34+ cells in the apheresis product in multiple myeloma patients before cryopreservation

сравнению с исходными цифрами и еще большее увеличение количества CD34-экспрессирующих клеток, а именно в 1,5 раза по сравнению с показателями до криоконсервирования. Теперь разрыв между числом колоний и клеток CD34+ стал еще больше — соотношение 1:11,3 соответственно, а до криоконсервирования — 1:3,8. Как видно на рис. 3, прослеживается, хотя и менее выраженная, чем на рис. 2, тенденция к прямой корреляции между клетками CD34+ и КОЕ у большей части пациентов. Как и до криоконсервирования, наблюдались значительные вариации в пропорции клеток CD34+ и КОЕ. Коэффициент корреляции Спирмена равен +0,286. Зависимость признаков статистически значима ($p < 0,05$).

Был проведен анализ КОЕ-ГМ у 25 больных до криоконсервирования клеток. Число КОЕ-ГМ колебалось от 20 до 548, в среднем 217,6 ± 25,6. Сопоставление количества клеток CD34+ и КОЕ-ГМ на 1 × 10^5 клеток у этих пациентов выявило прямую корреляцию между этими двумя показателями и статистически значимую связь, коэффициент корреляции Спирмена +0,312 ($p < 0,05$) (рис. 4).

Множественная миелома

У больных ММ количество клеток CD34+ в аферезном продукте до криоконсервирования было в среднем 1697,0 ± 206,1 × 10^5 (диапазон 230–4710 × 10^5). После размораживания клеточной взвеси число клеток CD34+ составило в среднем 2473,0 ± 294,7 × 10^5 (диапазон 255–7500 × 10^5), т. е. увеличилось почти в 1,5 раза, как и при лимфомах. Отличия статистически незначимы.

Число КОЕ в клеточной культуре до криоконсервирования клеток составило в среднем 396,6 ± 21,5 × 10^5 (диапазон 146–636 × 10^5). После размораживания трансплантата число КОЕ снизилось до 238,3 ± 19,4 × 10^5, что в 1,7 раза меньше, чем до замораживания.

Сопоставление числа клеток CD34+ и КОЕ в трансплантате до криоконсервирования (рис. 5) показало, что число клеток CD34+ более чем в 4 раза (1 × 4,27) превысило КОЕ на 1 × 10^5 клеток и, следовательно, колониеобразующей способностью обладало около 25 % клеток CD34+, как и у больных лимфомами. Коэффициент корреляции Спирмена между этими двумя показателями составил +0,051, отличия статистически незначимы ($p > 0,05$).

Анализ числа клеток CD34+ и количества колоний в культуре клеток после размораживания трансплантата показал, что число клеток CD34+ в 10 раз превышало число КОЕ на 1 × 10^5 клеток (рис. 6). До криоконсервирования это преобладание было значительно меньшим (1:4,27). Таким образом, после криоконсервирования имело место значительное снижение колониеобразующей способности ГСК и, наоборот, резкое увеличение количества клеток CD34+. Однако коэффициент корреляции Спирмена составил +0,25, отличия статистически незначимы ($p > 0,05$).

Проведенный у 32 больных ММ сравнительный анализ клеточного состава трансплантата на процентное содержание мононуклеарных клеток до и после криоконсервирования показал увеличение их содержания в размороженной взвеси клеток с 62,9 до 76,9 соответственно, т. е. в 1,22 раза. Отличия статистически незначимы ($p > 0,05$). Аналогичные результаты были получены у больных лимфомами.

Таким образом, у больных ММ не было выявлено корреляции между клетками CD34+ и числом всех КОЕ при большой вариабельности показателей.

Анализ количества КОЕ-ГМ на 1 × 10^5 клеток у 32 больных ММ до криоконсервирования позволил обнаружить колебания этого показателя от 39 до 300 (среднее значение 188,4 ± 21,2). Сопоставление количества клеток CD34+ и КОЕ-ГМ на 1 × 10^5 у этих пациентов выявило прямую корреляцию между ними и статистически значимую связь, как и у больных лимфомами. Коэффициент корреляции Спирмена составил +0,302, отличия статистически значимы ($p < 0,05$) (рис. 7).

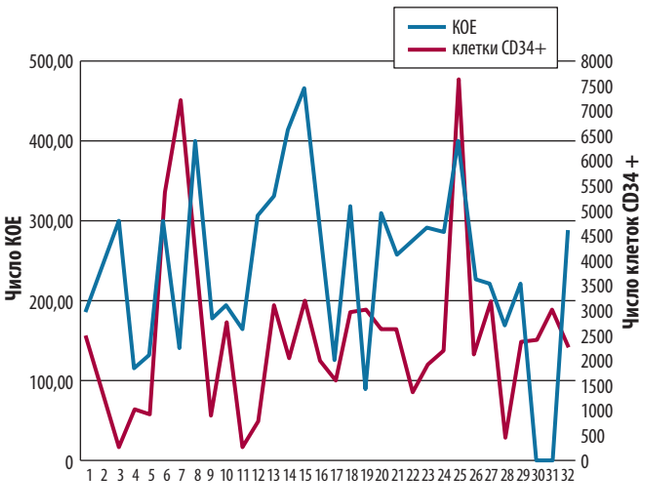

Рис. 6. Взаимосвязь числа колониеобразующих единиц (КОЕ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных множественной миеломой после размораживания

Fig. 6. Correlation between the count of colony-forming units (KOE) and CD34+ cells in the apheresis product in multiple myeloma patients after defrosting

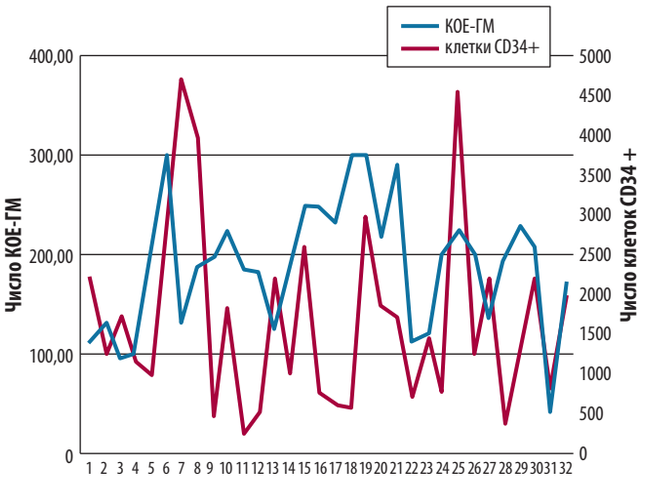

Рис. 7. Взаимосвязь числа гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единиц (КОЕ-ГМ) и клеток CD34+ в аферезном продукте у больных множественной миеломой до криоконсервирования

Fig. 7. Correlation between the count of granulocyte-macrophage colony-forming units (KOE-ГМ) and CD34+ cells in the apheresis product in multiple myeloma patients before cryopreservation

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучали корреляцию между количеством клеток CD34+ и КОЕ в продукте афереза у больных с лимфомами и ММ, получивших реинфузию аутологичных ГСК периферической крови.

Среди исследователей и клиницистов вопрос о преимуществе клеток CD34+ перед КОЕ в культуре при оценке качества трансплантата, эффективности трансплантации и прогноза заболевания остается предметом спора. На что в большей степени должен опираться врач, планирующий трансплантацию ГСК? Ряд авторов полагает, что культура клеток *in vitro*, где проявляется функция ГПК, родоначальных для гранулоцитарно-моноцитарных и эритроидных линий, может давать информацию, позволяющую предсказывать кинетику гемопоэтического восстановления [25]. Есть согласие в том, что существует порог потребности в КОЕ-ГМ, ниже которого возникает значительный риск затяжного восстановления гемопоэза, особенно тромбоцитов.

Более простым и продуктивным методом определения ГСК и потенциального приживления трансплантата, по мнению других исследователей, является многоцветная мультипараметрическая проточная цитометрия, более информативная при определении клеток CD34+ [26–29]. Однако M.J. Watts и соавт. [30] на основе многофакторного анализа у больных лимфомами показали, что уровень КОЕ-ГМ является более прогностически важным и информативным, чем измерение числа клеток CD34+. Авторы осуществляли больным с лимфомами реинфузию ГСК периферической крови, в которой содержание клеток CD34+ было ниже установленного ими оптимального уровня ($< 3{,}5 \times 10^6$/кг). Однако у части больных, получивших дозу КОЕ-ГМ выше оптимального порога для КОЕ-ГМ ($> 3{,}5 \times 10^5$/кг), отмечалась более быстрая регенерация. S. Serke и соавт. [31], обследовав большое число больных ММ и лимфомами, пришли к выводу, что если число собранных клеток CD34+ оказывалось очень низким, тем не менее в ряде случаев число КОЕ-ГМ оставалось выше принятого оптимального уровня.

Вопрос о существовании корреляции между ГСК CD34+ и КОЕ в культуре, как и вопрос преимущества того и другого показателя для оценки эффективности трансплантации, является также спорным и трудноразрешимым. В более ранних работах сообщалось о линейной корреляции между клетками CD34+ и КОЕ, хотя отмечалось, что согласованность этих параметров весьма вариабельна и не является абсолютной на индивидуальном уровне [25, 32–34]. M. Buzzi и соавт. [35] показали хорошую связь лейкоцитов, клеток CD34+ и КОЕ-ГМ. По данным Л.Ю. Андреевой и соавт. [36], не найдено корреляции между относительным содержанием клеток CD34+ среди лейкоцитов и числом колоний в аферезном продукте, за исключением БОЕ-Э, которые коррелировали с числом клеток CD34+. Однако количество клеток CD34+ на 1 кг массы тела пациента находилось в прямой зависимости от колониеобразующей способности клеток продукта афереза, а абсолютное число клеток CD34+ в 1 мкл цитоконцентрата также коррелировало с показателями колониеобразования. Сообщалось также об отсутствии какой-либо связи между ними на фоне значительных вариаций в их пропорциях [37, 38]. Приводились данные о наличии обратной корреляции, т. е. чем больше число клеток CD34+, тем меньше число КОЕ [31]. Те же авторы, однако, в подтверждение вариабельности результатов отмечали, что нет сомнений в том, что положительная скрытая корреляция между этими показателями существует. Для объяснения же обратной корреляции авторы допускали возможность системных ошибок при подсчете клеток CD34+ и КОЕ. Тем не менее они считали более вероятным, что когда

мобилизация эффективна, с высоким числом клеток CD34+ в периферической крови, тогда большая их часть могла быть более примитивной, чем при менее эффективной мобилизации. Примитивные клетки (HPP-CFC, LTC-IC, PHSC и др.) находились на уровне развития, неопределяемом с помощью исследования КОЕ-ГМ и БОЕ-Э. Как альтернативу этому авторы выдвигали предположение, что когда достигнута хорошая мобилизация, то большая часть клеток CD34+ является более зрелой, чем определяемые в культуре КОЕ-ГМ и БОЕ-Э. Таким образом, в этих вопросах нет согласия.

Данные, полученные с помощью проточной цитометрии, показывают, что большая часть КОЕ-ГМ находится в популяции клеток CD34+ с коэкспрессией CD45RA, но в то же время авторы не выявили корреляции клоногенности с содержанием клеток CD34+CD45RA+ [16, 17]. Учитывая, что популяция клеток CD34+ неоднородна и может быть подразделена на субпопуляции, основываясь на дифференциальной экспрессии других антигенов, необходимо проводить более глубокий фенотипический анализ, чтобы проанализировать эти клетки на их способность к колониеобразованию.

В настоящем исследовании было выявлено значительное преобладание в продукте афереза больных с лимфомами и ММ до и после криоконсервирования числа клеток CD34+ над количеством всех КОЕ *in vitro*. Подобные результаты были получены рядом других исследователей [37]. Определение коэффициента Спирмена (коэффициент до криоконсервирования +0,53, коэффициент после размораживания +0,286) показало статистически значимую прямую корреляцию исследуемых признаков до и после криоконсервирования у пациентов с лимфомами. Кроме того, обнаружена статистически значимая корреляция между клетками CD34+ и КОЕ-ГМ в культуре у больных лимфомами и ММ до криоконсервирования (коэффициент Спирмена +0,312 и +0,302 соответственно).

Это может объясняться тем, что практически все репопулирующие костный мозг клетки, от ранних ГСК до прекурсорных, являются CD34-экспрессирующими. Все они в различных пропорциях присутствуют в трансплантате, но колониеобразующей способностью в культуре обладают преимущественно ГПК. Это объяснение не кажется достаточно убедительным ввиду того, что, как известно, ГПК составляют большую часть среди репопулирующих клеток. Кроме того, доля плюри- и мультипотентных ГСК слишком мала, чтобы они могли создать такое преимущество для клеток CD34+. Очевидно также, что не все ГПК обладают клоногенной активностью *in vitro* в любой момент [39]. По-видимому, нужно искать и другие объяснения этому факту. Не было найдено связи между клетками CD34+ и КОЕ в культуре у больных ММ ни до, ни после криоконсервирования. Имела место выраженная вариабельность этих показателей. Однако обнаружена корреляция между клетками CD34+ и КОЕ-ГМ в культуре у больных ММ до криоконсервирования (коэффициент Спирмена +0,302).

Ранее мы уже получили данные о значительном снижении числа КОЕ в трансплантате у больных с лимфомами и ММ после размораживания [40, 41]. Можно предположить, что снижение числа КОЕ в размороженной клеточной взвеси объясняется не только гибелью части ГСК и ГПК, но и есть следствие того, что в этих экстремальных для клеток условиях часть их, оставаясь в компартменте CD34-экспрессирующих клеток, утрачивает способность к колониеобразованию навсегда или временно [25].

Нуждается в изучении и преобладание числа клеток CD34+ в размороженном аферезном продукте по сравнению с исходными (до криоконсервирования) показателями.

Одно из объяснений заключается в том, что, как известно, в результате криоконсервирования и размораживания клеточной взвеси в первую очередь погибают нейтрофилы, а доля мононуклеаров в единице измерения возрастает. В то же время увеличение процентного содержания мононуклеарных клеток в лейкоцитарной формуле из клеток аферезного продукта после его размораживания менее значимо (в 1,2 раза) и статистически незначимо по сравнению с повышением числа клеток CD34+ (в 1,5 раза). Вероятно, есть и другие причины такого увеличения содержания клеток CD34+ после размораживания.

Таким образом, можно заключить, что для оценки эффективности мобилизации клеток, афереза и качества трансплантата имеет значение каждый из этих двух методов. При наличии прямой корреляции между ними их информативность возрастает и они дополняют друг друга. Однако клиническое значение может иметь и установление обратной связи между ними. Если определяется высокое число клеток CD34+, но мало КОЕ (меньше оптимального порога), это служит показанием для дополнительного сбора клеток.

Преимуществом метода проточной цитометрии считается то, что можно быстро определить количество клеток CD34+ и установить критерий адекватности дозы периферических стволовых клеток при аутоТГСК. В то же время методы определения клеток CD34+ — иммунопозитивный сортинг с помощью моноклональных антител и иммунонегативный сортинг (на магнитных колонках) — основаны на фенотипических, а не на функциональных характеристиках, поэтому важен анализ клоногенных параметров ГСК, т. к. именно культуральные методы характеризуют функцию этих клеток. К недостаткам культуральных методов относится ретроспективный характер полученной информации, поскольку культивирование продолжается 14 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно с полным основанием утверждать, что показатель колониеобразующей способности клеток, используемый для учета функционально-активных ГСК и ГПК, является не менее надежным критерием оценки состояния пролиферативного пула трансплантата, чем клетки CD34+. Он представляет истинное количество способных к восстановлению гемопоэза клеток. Число КОЕ-ГМ и БОЕ-Э коррелирует с приживлением трансплантата.

Таким образом, анализируя одновременно два разных показателя, можно планировать интенсив-

ность режима мобилизации и объем ростовых факторов, назначаемых в период посттрансплантационной аплазии. Для оценки количественного и качественного состояния аутотрансплантата у больных с лимфомами и ММ необходимо использовать оба метода исследования.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-6706.2018.7.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: В.А. Балашова, В.И. Ругаль, С.В. Грицаев.
Сбор и обработка данных: В.А. Балашова, Ж.В. Чубукина, Н.Ю. Семенова, А.В. Шмидт, А.Д. Гарифуллин, И.М. Запреева, А.А. Кузяева, И.И. Кострома, А.Ю. Кувшинов.
Предоставление материалов исследования: В.А. Балашова, С.В. Грицаев, С.В. Волошин, Ж.В. Чубукина, А.В. Шмидт, А.Д. Гарифуллин, И.М. Запреева, А.А. Кузяева, И.И. Кострома, А.Ю. Кувшинов.
Анализ и интерпретация данных: В.А. Балашова, В.И. Ругаль, С.В. Грицаев, С.В. Волошин, Ж.В. Чубукина, Н.Ю. Семенова, С.С. Бессмельцев.
Окончательное одобрение рукописи: В.А. Балашова, В.И. Ругаль, С.В. Грицаев, С.В. Волошин, С.С. Бессмельцев, А.В. Чечеткин.
Административная поддержка: С.С. Бессмельцев, А.В. Чечеткин.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lansdorp PM. Self-renewal of stem cells. Biol Blood Marrow Transplant. 1997;3(4):171–8.
2. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue specific stem cell. Am J Pathol. 2006;169(2):338–46. doi: 10.2353/ajpath.2006.060312.
3. Wodnar-Filipowicz A. Biological properties of haematopoietic stem cells. The EBMT Handbook, 6th edition; 2012. pp. 61–72.
4. Moreb JS, Salmosinia D, Hsu J, et al. Long-term outcome after autologous stem cell transplantation with adequate peripheral blood stem cell mobilization using plerixafor and G-CSF in poor mobilizer lymphoma and myeloma patients. Adv Hematol. 2011;2011:1–8. doi: 10.1155/2011/517561.
5. Птушкин В.В., Жуков Н.В., Миненко С.В. и др. Роль высокодозной химиотерапии с трансплантацией стволовых кроветворных клеток у больных с неходжкинскими лимфомами. Онкогематология. 2006;1–2:86–96.
[Ptushkin VV, Zhukov NV, Minenko SV, et al. Role of high-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphomas. Onkogematologiya. 2006;1–2:86–96. (In Russ)]
6. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroup Francophone du Myeloma. Blood. 2007;109(8):3489–95. doi: 10.1182/blood-2006-08-040410.
7. Avet-Loiseau H, Soulier J, Fermand JP, et al. Impact of high-risk cytogenetics and prior therapy on outcomes in patients with advanced relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone. Leukemia. 2010;24(3):623–8. doi: 10.1038/leu.2009.273.
8. Dabusti M, Lanza F, Campioni D, et al. CXCR4 expression on bone marrow CD34+ cells prior to mobilization can predict mobilization adequacy in patients with hematological malignancy. J Hematother Stem Cell Res. 2003;12(4):425–34. doi: 10.1089/152581603322286051.
9. Ratip S. Mobilization failure in hematopoietic stem cell transplantation. XXXIX Ulusal Hematoloji Kongresi. Antalya, Turkey; 2013. pp. 106–10.
10. Артюхина З.Е., Семенова Н.Ю., Балашова В.А. и др. Кроветворная ткань и стромальное микроокружение больных множественной миеломой. Вестник гематологии. 2017;13(1):15–8.
[Artyukhina ZE, Semenova NYu, Balashova VA, et al. Hematopoietic tissue and stromal microenvironment in patients with multiple myeloma. Vestnik gematologii. 2017;13(1):15–8. (In Russ)]
11. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома: руководство для врачей. М.: МК, 2016. 504 с.
[Bessmeltsev SS, Abdulkadyrov KM. Mnozhestvennaya mieloma: rukovodstvo dlya vrachei. (Multiple myeloma: manual for doctors.) Moscow: MK Publ.; 2016. 504 p. (In Russ)]
12. Покровская О.С., Менделеева Л.П., Гальцева И.В. и др. Мобилизация гемопоэтических клеток крови у больных миеломной болезнью. Проблемы гематологии и переливания крови. 2003;2:55–65.
[Pokrovskaya OS, Mendeleeva LP, Gal'tseva IV, et al. Mobilization of hematopoietic cells in myeloma patients. Problemy gematologii i perelivaniya krovi. 2003;2:55–65. (In Russ)]
13. Покровская О.С. Кроветворная ткань и стромальное микроокружение в процессе интенсивной терапии и мобилизации гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2011.
[Pokrovskaya OS. Krovetvornaya tkan' i stromal'noe mikrookruzhenie v protsesse intensivnoi terapii i mobilizatsii gemopoeticheskikh stvolovykh kletok u bol'nykh mnozhestvennoi mielomoi. (Hematopoietic tissue and stromal microenvironment in intensive treatment and mobilization of hematopoietic stem cells in multiple myeloma patients.) [dissertation] Moscow; 2011. (In Russ)]
14. Haizmann M, O'Meara AC, Moosmann PR, et al. Efficient mobilization of PBSC with vinorelbine/G-CSF in patients with malignant lymphoma. Bone Marrow Transplant. 2009;44(2):75–9. doi: 10.1038/bmt.2008.434.
15. Haverkos BM, McBride A, O'Donnell L, et al. An effective mobilization strategy for lymphoma patients after failed upfront mobilization with plerixafor. Bone Marrow Transplant. 2014;49(8):1052–5. doi: 10.1038/bmt.2014.90.
16. Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. J Exp Med. 1990;172(1):363–6. doi: 10.1084/jem.172.1.363.
17. Fritsch G, Buchinger P, Printz D, et al. Rapid discrimination of early CD34+ myeloid progenitors using CD45-RA analysis. Blood. 1993;1(9):2301–9.
18. Fritsch G, Buchinger P, Printz D. Use of flow cytometric CD34 analysis to quantify hematopoietic progenitor cells. Leuk Lymphoma. 1993;10(6):443–51. doi: 10.3109/10428199309148201.
19. Nissen-Druey C, Tichelli A, Mayer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. Acta Haematol. 2005;113(1):5–10. doi: 10.1159/000081987.
20. Takano H, Ema H, Sudo K, et al. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: Inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. J Exp Med. 2004;199(3):295–302. doi: 10.1084/jem.20030929.
21. Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, et al. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. Blood. 2006;107(6):2311–6. doi: 10.1182/blood-2005-07-2970.
22. Guo Y, Lubbert M, Engelhard M. CD34-hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. Stem Cell. 2003;21(1):15–20. doi: 10.1634/stemcells.21-1-15.
23. Donahue RE, Yang YC, Clark SC. Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. Blood. 1990;75(12):2271–5.
24. Ema H, Suda T, Miura Y, Nakauchi H. Colony formation of clone-sorted human haematopoietic progenitors. Blood. 1990;75(10):1941–6.
25. Serke S, Sauberlich S, Huhn D. Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD34+ cells: correlation to the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony-assay. Br J Haematol. 2008;77(4):453–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb08609.x.
26. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, et al. 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(4):825–31. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb06744.x.
27. Bensinger WI, Appelbaum F, Rowley S, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. J Clin Oncol. 1995;13(10):2547–55. doi: 10.1200/jco.1995.13.10.2547.
28. Weaver CH, Haselton B, Birch R, et al. An analysis of engrafment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after administration of myeloablative chemotherapy. Blood. 1995;86(10):3961–9.
29. Weaver CH, Potz J, Redmond J, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood cells with a low CD34+ cell content. Bone Marrow Transplant. 1997;19(11):1103–10. doi: 10.1038/sj.bmt.1700808.
30. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor, an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these

parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. J Clin Oncol. 1997;15(2):535–46. doi: 10.1200/jco.1997.15.2.535.

31. Serke S, Watts M, Knudsen LM, et al. In-vitro clonogenity of mobilized peripheral blood CD34 expressing cells: inverse correlation to both relative and absolute number of CD34-expressing cells. Br J Haematol. 1996;95(2):234–40. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1918.x.

32. Fritsch G, Emminger W, Buchinger P, et al. CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. Exp Hematol. 1991;19(11):1079–83.

33. Fritsch G, Emminger W, Buchinger P, et al. CD34 analysis in peripheral blood correlates with colony-forming capacity. Progr Clin Biol Res. 1992;377:531–6.

34. Scott MA, Ager S, Apperley JF, et al. Peripheral blood progenitor cell harvesting in multiple myeloma and malignant lymphoma. Leuk Lymphoma. 1995;19(5–6):479–84. doi: 10.3109/10428199509112208.

35. Buzzi M, Granchi D, Bacci G, et al. CD34+ cells and clonogenicity of peripheral blood stem cells during chemotherapy treatment in association with granulocyte colony stimulating factor in osteosarcoma. J Chemother. 1999;11(4):293–300. doi: 10.1179/joc.1999.11.4.293.

36. Андреева Л.Ю., Тупицын Н.Н., Овумян Г.Ш. и др. Гемопоэтические предшественники в крови онкологических больных: взаимосвязь колониеобразования и экспрессии CD34. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2000;11(1):5–10.

[Andreeva LYu, Tupitsyn NN, Ovumyan GSh, et al. Hematopoietic progenitors in blood of cancer patients: relationship between colony formation and CD34 expression. Vestnik RONTs im NN Blokhina RAMN. 2000;11(1):5–10. (In Russ)]

37. Healy LE, Nirsimloo N, Scott M, et al. In vitro proliferation by cells mobilized into the peripheral blood for collection and autologous transplantation. Exp Hematol. 1994;22(13):1278–82.

38. Magagnoli M, Spina M, Balzarotti M, et al. IGEV regimen and a fixed dose of lenograstim: an effective mobilization regimen in pretreated Hodgkin's lymphoma patients. Bone Marrow Transplant. 2007;40(11):1019–25. doi: 10.1038/sj.bmt.1705862.

39. Koutna I, Peterkova M, Simara P, et al. Proliferation and differentiation potential CD133+ and CD34+ populations from the bone marrow and mobilized peripheral blood. Ann Hematol. 2011;90(2):127–37. doi: 10.1007/s00277-010-1058-2.

40. Балашова В.А., Ругаль В.И., Грицаев С.В. и др. Колониеобразующая способность гемопоэтических стволовых клеток мобилизованной периферической крови больных множественной миеломой до и после криоконсервирования. Трансфузиология. 2016;17(4):63–70.

[Balashova VA, Rugal' VI, Gritsaev SV, et al. Colony-forming capacity of hematopoietic stem cells of mobilized peripheral blood in multiple myeloma patients before and after cryopreservation. Transfuziologiya. 2016;17(4):63–70. (In Russ)]

41. Балашова В.А., Ругаль В.И., Бессмельцев С.С. и др. Колониеобразующая способность гемопоэтических стволовых клеток мобилизованной периферической крови больных злокачественными лимфомами до и после криоконсервирования. Medline. 2018;19(3):45–54.

[Balashova VA., Rugal VI., Bessmeltsev SS. et al. Colonyforming capacity of hematopoietic stem cells of mobilized peripheral blood in patients with malignant lymphomas before and after cryopreservation. Medline. 2018;19(3):45–54. (In Russ)]