

ВЛИЯНИЕ ОТМЫВАНИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА СВОЙСТВА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Степанов А.А.¹, Коротаев Е.В.¹, Бессмельцев С.С.², Рабинович В.И.¹, Астахова Л.П.¹,
Пономарев С.А.¹

¹АУ «Югорский НИИ клеточных технологий с банком стволовых клеток»,
Ханты-Мансийск, Россия г. Ханты-Мансийск, ул. Мира 127-Б, тел./факс (3467)32-87-46
эл. почта: glagolmail@gmail.com

²ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

Резюме. В статье, на основании многочисленных опубликованных данных, теоретически обоснована токсикодинамика криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО), применяющегося при криоконсервации трансплантационного материала в онкогематологии. Рассмотрены варианты клинических проявлений токсического эффекта ДМСО на пациента. В стендовых испытаниях исследовано влияние наиболее распространенного способа отмывания ДМСО из трансплантационного материала на цитоллиз содержащихся в нем лейкоцитов, связанные с отмыванием потери гемопоэтических стволовых клеток и снижение их колониеобразующей активности.

Ключевые слова: гемопоэтическая стволовая клетка, трансплантация, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, лейкоцитаферез

EFFECT OF CLEANING TRANSPLANTATION MATERIAL FROM CRYOPROTECTANT DMSO ON PROPERTIES HEMATOPOIETIC STEM CELL

Stepanov A.A.¹, Korotaev E.B.¹, Bessmeltsev S.S.², Rabinovich V.I.¹, Astahova L.P.¹,
Ponomarev S.A.¹

¹Ugra research Institute of cellular technologies with stem cell Bank, Khanty-Mansiysk, Russia
str. Mira 127-B, tel./fax (3467) 32-87-46, e-mail: glagolmail@gmail.com

²FGBU "Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical
and Biological Agency", Saint-Petersburg

Abstract: There are some reasons of mechanism of toxic effect of dimethylsulfoxid (DMSO - cryoprotection by blood marrow transplantations) from many publications in this article. There are clinic symptoms of theses mechanisms. We made the experiment about most popular method

of cleaning transplantations material from DMSO and after that we research of concentration and hemopoietic function of stem cells and cytotoxic effect of leukocytes.

Key words: hemopoietic stem cells, blood marrow transplantation, leukocytapheresis.

Высокодозовая химиотерапия с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является стандартом современной терапии онкогематологических заболеваний [1, 2]. Успех этого вида терапии во многом зависит от качества трансплантационного материала. Одним из критериев качества является его безопасность. Побочные эффекты, возникающие во время введения трансплантационного материала, можно разделить на три основные группы по механизмам возникновения:

- *«Эффекты холодной крови»* – возникают вследствие раздражения блуждающего нерва при трансфузии холодного трансплантационного материала. Такими побочными эффектами являются тошнота, рвота, нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы и дыхания, которые наблюдаются, примерно, у 50% пациентов [3];
- *Цитолиз клеток трансплантационного материала* вследствие криоповреждений, возникающих при замораживании-оттаивании. В зависимости от вида клеток, которые подверглись цитолизу, и его степени, может развиваться гемоглобинемия, повышение ЛДГ, гипотензия, озноб [4, 5];

Побочные эффекты, связанные с действием на пациента криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО), содержащегося в трансплантационном материале [6, 7].

«Эффекты холодной крови» легко предотвратить, регулируя температуру материала во время инфузии. Исключить побочные эффекты, связанные с гемолизом эритроцитов можно путем их удаления в процессе лейкоцитафереза. Свести к минимуму цитолиз ядросодержащих клеток возможно путем введения в трансплантационный материал криопротектора ДМСО. С другой стороны, по мнению различных авторов, специфические физико-химические свойства ДМСО обуславливают его токсичность, как в отношении клеток трансплантационного материала, так и организма пациента [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Связь серы с кислородом ($S=O$) в молекуле ДМСО образует диполь, обеспечивая его бесконечную растворимость в воде, а также обуславливая высокую растворимость водорастворимых веществ в самом ДМСО. Между молекулами воды и ДМСО легко образуются водородные связи – более стабильные, чем водородные связи между молекулами воды. Это приводит к снижению кристаллообразования при замерзании биоматериала, тем самым обеспечивается криопротективность [13]. Однако, в то же

время, это свойство обуславливает временное увеличение осмолярности межклеточной среды, что может вызывать нарушения функций мембран клеток и вести к цитолизу в момент введения криопротектора в трансплантационный материал [6].

Отрицательный заряд атома кислорода обеспечивает молекуле ДМСО возможность выступать в роли активного акцептора протонов. Считается, что это свойство позволяет молекуле ДМСО обратимо изменять конформацию гидрофобной части молекул фосфолипидов, обеспечивая высокую проницаемость ДМСО через мембрану клеток путем обычной диффузии по градиенту концентрации [14]. Таким образом, криопротекторные свойства ДМСО реализуются не только в межклеточной среде, но и внутриклеточно. Это же свойство ДМСО обуславливает высокую проницаемость криопротектора во все ткани организма. Способность ДМСО растворять различные вещества в совокупности с высокой проницаемостью в ткани и клетки делает его эффективным трансдермальным переносчиком действующих веществ при выполнении наружной противовоспалительной и антибактериальной терапии. Однако необходимо учитывать, что увеличение биодоступности некоторых тканей и органов, как для лекарственных препаратов, так и для различных ксенобиотиков и эндогенных токсинов может иметь негативные последствия. Например, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера для некоторых веществ может вызывать многочисленные нарушения как соматических, так и вегетативных функций организма.

Таким образом, ряд побочных эффектов, возникающих при трансплантации, можно объяснить влиянием ДМСО на токсикокинетику эндогенных токсинов. В ряде публикаций отмечены респираторные нарушения вплоть до остановки дыхания [15, 11, 12] и диффузные легочные кровотечения [7]. Некоторые авторы наблюдали нарушения со стороны центральной нервной системы, такие как обратимая лейкоэнцефалопатия [9], эпилептические припадки [8] и инсульт [10, 12]. Перечисленные побочные эффекты авторы связывают с токсическими эффектами криопротектора ДМСО.

Однако теоретический анализ не позволяет сделать вывод о наличии побочных эффектов связанных с токсичностью непосредственно самого ДМСО. Молекула этого препарата химически достаточно инертна, а летальная доза (ЛД₅₀) составляет 20 000 мг/кг массы тела у мышей, что не сопоставимо с дозировками при инфузии трансплантационного материала, содержащего ДМСО (300 - 500 мг/кг).

Какие же существуют способы предотвращения побочных эффектов связанных с ДМСО?

1. Порционное введение трансплантационного материала – данный способ заключается в разделении суммарного объема трансплантата на несколько порций, тем самым снижается количество ДМСО, введенное с материалом в течение одной инфузии (не более 1 г ДМСО/кг массы тела за одну инфузию [16]). При этом достаточно паузы между инфузиями в 10 – 20 минут, чтобы, благодаря активной кинетике распределения ДМСО по организму и высокой скорости его выведения легкими и почками [16], избежать проявления побочных эффектов. Данный способ наиболее прост, однако он не ведет к снижению суммарного количества ДМСО получаемого пациентом при операции трансплантации.

2. Редукция объема материала позволяет уменьшить количество ДМСО необходимое для криохранения меньшего по объему трансплантационного материала. Редукция выполняется автоматизированными или ручными методами, но в любом случае она основана на воздействии центробежных сил на форменные элементы крови, которые осаждаются, отделяясь от плазмы. Продукт фракционирования подвергается плазмозэкстракции. При этом возможны потери ГСК вместе с удаляемой плазмой. Кроме того, центробежные силы могут негативно влиять на способность ГСК к кроветворению [17].

3. Отмывание трансплантационного материала от ДМСО предполагает многократное разведение трансплантационного материала аутоплазмой с последующим фракционированием и плазмозэкстракцией. При этом концентрация ДМСО значительно уменьшается в соответствии с кратностью разведения материала. Данный способ технологически идентичен методу редукции объема материала, поэтому недостатки этих методов одинаковы. Однако имеются публикации, в которых утверждается, что влияние данных манипуляций на жизнеспособность ГСК, определенную методом проточной цитометрии, не значимо [18]. Следует отметить, что данный лабораторный метод не позволяет в полной мере оценить способность ГСК к восстановлению кроветворения.

С учетом выше сказанного нами было выполнено стендовое исследование влияния наиболее распространенного способа отмывания ДМСО на принципиальные свойства трансплантационного материала.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследования была выбрана пуповинная кровь (ПК), полученная в процессе естественных родов, непосредственно после отделения плаценты, из плацентарного сегмента пуповинной вены. Полученный материал был подготовлен к хранению путем добавления криопротектора ДМСО в конечной концентрации 7,5 %.

Далее его подвергали замораживанию и хранению в жидком азоте. Размораживание материала выполнялось на водяной бане при +40°C в течение 1 – 2 минут до достижения однородной клеточной взвеси. Сразу после размораживания производился отбор пробы для анализа методами проточной цитометрии и культивирования.

Далее выполнялось отмывание биоматериала от ДМСО. Из криопакета с биоматериалом в стерильных условиях отбирали 2 мл пробы в центрифужную пробирку на 15 мл. Добавлением к образцу раствора RPMI доводили объем до 10 мл. Таким образом, получали пятикратное разведение пробы, а концентрация ДМСО снижалась до 1,5%. В последующем пробирку с пробой центрифугировали при 600 оборотов в минуту в течение 20 минут. После центрифугирования 8 мл образовавшегося супернатанта, не содержащего клетки, удаляли. К оставшейся суспензии клеток снова добавляли RPMI доводя объем клеточной взвеси до 10 мл. Таким образом, получали в материале концентрацию ДМСО 0,3%. Снова центрифугировали и снимали супернатант, как указано выше. Полученную суспензию клеток тщательно перемешивали и выполняли исследования методами проточной цитометрии и культивирования для оценки влияния отмывания на количество ГСК и их способность к кроветворению. Количество ГСК в пробах определяли на проточном цитометре CYTOMICS FC 500, с использованием набора реагентов Stem-Kit Reagents по международному протоколу ISHAGE.

Для изучения колониобразующей активности ГСК была использована готовая метилцеллюлозная среда MethoCultH4434 Classic, содержащая факторы роста. Инкубирование проводилось в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, температуре +37°C и относительной влажности 95%. Оценка результатов проводилась на 14 день культивирования, при помощи световой микроскопии на инвертируемом микроскопе путем подсчета колоний.

Для анализа различий между группами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни, так как объем проведенного исследования не позволял применить более сильные параметрические методы.

Результаты и обсуждение

В результате отмывания от ДМСО трансплантационного материала перед трансплантацией, достигалось снижение его концентрации в 25 раз (согласно кратности разведения при выполнении процедуры отмывания). То есть, при исходной концентрации ДМСО 7,5%, после отмывания она составила 0,3%.

Однако, при исследовании влияния процесса отмывания от ДМСО, было выявлено снижение количества ГСК на $18 \pm 8\%$ и статистически достоверное снижение колониеобразующей активности ГСК на $45 \pm 11\%$ ($p \leq 0,05$) (Табл. 1). Величина данных потерь, а также большие стандартные отклонения характеризуют данный процесс отмывания как неуправляемый, что не позволит прогнозировать получаемую пациентом трансплантационную дозу. Достоверных изменений величины цитолитической активности лейкоцитов в процессе отмывания не выявлено.

Таблица 1

Результаты исследования изменения количества ГСК, цитолитической активности лейкоцитов и колониеобразующей активности ГСК в размороженных образцах ПК при их отмывании от ДМСО (n=14).

Изменение количества ГСК, %, $X \pm \sigma$	Изменение количества лейкоцитов с целыми мембранами, %, $X \pm \sigma$	Изменение КОЕ, %, $X \pm \sigma$
72,2 $\pm$ 30,5	111,2 $\pm$ 18,9	55,2 $\pm$ 13,3

Заключение

Таким образом, отмывание от ДМСО трансплантационного материала с целью снижения вероятности побочных эффектов, привело к снижению количества ГСК и их способности к кроветворению. Это необходимо учитывать при планировании трансплантации и принятии решения о выполнении отмывания трансплантационного материала от ДМСО, в тех клинических случаях, когда данная процедура клинически целесообразна. Кроме того, сама процедура отмывания от ДМСО, содержащегося в больших объемах трансплантационного материала, выделенного из периферической крови, требует автоматизации и обеспечения условий, исключающих инфекционную контаминацию.

Литература

1. Barlogie et al. Duration of survival in patients with myeloma treated with Thalidomide //The New England Journal of Medicine. – 2008. – № 359. P 1410 – 24.
2. Harousseau J. L. At all Role of stem cell transplantation //Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2007. – Vol. 21. – P. 1157 – 74.

3. Zambelli A., Poggi G., Da Prada G. et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion //Anticancer Res. – 1998. – Vol. 18. – P. 4705 – 4708.
4. Burger J., Gilmore M.J., Jackson B. et al. Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation //Bone Marrow Transplant. – 1991. – Vol. 7. – P. 322 – 324.
5. Gomez S., Nagler A., Naparstek E., Slavin S.. Transient elevation of serum lactic dehydrogenase following autologous bone marrow transplantation //Bone Marrow Transplant. – 1991. – Vol. 7. – P. 487 – 488.
6. Усс А.Л., Мицкевич П.Б., Завгородняя И.Л. Криоконсервирование клеток человека//Медицинская панорама. – 2003. - №2. - с. 38-39.
7. Corso S., Vukelja S.J., Wiener D. et al. Diffuse alveolar hemorrhage following autologous bone marrow infusion //Bone Marrow Transplant. – 1993. – Vol. 12. – P. 301 – 303.
8. Hequet O., Dumontet C., El Jaafari-Corbin A. et al. Epileptic seizures after autologous peripheral blood progenitor infusion in a patient treated with high-dose chemotherapy for myeloma //Bone Marrow Transplant. – 2002. – Vol. 29. – P. 544.
9. Higman M.A., Port J.D., Beauchamp Jr N.J. et al. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells //Bone Marrow Transplant. – 2000. – Vol. 26. – P. 797 – 800.
10. Hoyt R., Szer J., Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells //Bone Marrow Transplant. – 2000. – Vol. 25. – P.1285 – 1287.
11. Miniero R., Vai S., Giacchino M. et al.. Severe respiratory depression after autologous bone marrow infusion //Haematologica. – 1992. – Vol. 77. – P. 98 – 99.
12. Windrum P., Morris T.C.. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation //Bone Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 31. – P. 315.
13. Криоконсервирование клеточных суспензий. Цунаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
14. Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. Действие диметилсульфоксида на гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека // Проблемы криобиологии. – 1996. - №2. - С. 25-30.
15. Benekli M., Anderson B., Wentling D. et al. Severe respiratory depression after dimethyl sulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis//BoneMarrow Transplant. – 2000. – Vol. 25. – P.1299 – 1301.

16. Румянцев А. Г., Масчан А. А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: Руководство для врачей. //М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 912 с.
17. Коротаев Е. В., Степанов А. А., Рабинович В. И. Преимущества и недостатки обработки по Рубинштейну материала для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Эфферентная физико-химическая медицина – 2012. – № 3. – С. 21 – 25.
18. Syme R., Bewick M., Stewart D. et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity // Blood Marrow Transplant. – 2004. – № 10(2). – P.135 – 141.