

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ВЫСОКОМ ЛЕЙКОЦИТОЗЕ

Степанов А.А.¹, Коротаев Е.В.¹, Бессмельцев С.С.², Рабинович В.И.¹, Пономарев С.А.¹,
Хорева О.Е.³

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

³БУ «Сургутская окружная клиническая больница», Сургут

Резюме. Показано, что концентрация ядросодержащих клеток (ЯСК) в лейкоконцентрате, полученном путем лейкоцитафереза из периферической крови, – высоковариабельный показатель ($46 - 370 \times 10^9$ ЯСК/л), который влияет на сохранность гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на этапе добавления в трансплантат криопротектора диметилсульфоксида. Зарегистрировано 16% клинических случаев, когда сохранность ГСК после добавления диметилсульфоксида составила менее 50% от заготовленной дозы. При этом данные лейкоконцентраты имели лейкоцитоз более 150×10^9 ЯСК/л. Нами предложен метод расчета объема аутоплазмы необходимой для разбавления трансплантата с целью снижения его лейкоцитоза ниже 150×10^9 ЯСК/л. Апробация метода показала возможность достоверно ($p < 0,05$) повысить сохранность ГСК при криоконсервации.

Ключевые слова: аутологичная трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, криоконсервация, криопротектор, лейкоцитаферез.

CRYOPRESERVATION HEMATOPOIETIC STEM CELLS OBTAINED FROM PERIPHERAL BLOOD WITH HIGH LEUKOCYTOSIS

Stepanov A.A.¹, Korotaev E.V.¹, Bessmeltsev S.S.², Rabinovich V.I.¹, Ponomarev S.A.¹,
Khoreva O.E.³

¹ *Ugra 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*

² *Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg*

³ *BU "Surgut district Hospital", Surgut*

Abstract. The concentration of nucleated cells in the peripheral blood apheresis product, - highly variable parameter ($46 - 370 \times 10$ leukocytes/liter), which reduces the safety of stem cells in addition to the graft dimethyl sulfoxide. It registered 16% of clinical cases where the safety of stem cells was less than 50% of the harvested dose. In these cases leukocytosis was $>150 \times 10$ leukocytes/liter. We have developed a method for calculating the amount of autologous blood plasma needed to dilute the graft to reduce leukocytosis below 150×10 leukocytes/liter. Testing method showed the ability to significantly ($p < 0,05$) increase in the safety of GSK cryopreservation.

Key words: apheresis, autologous transplantation, cryopreservation, cryoprotector, hematopoietic stem cells.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является эффективным методом восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Динамика восстановления кроветворения зависит от количества трансплантированных ГСК и во многом определяет успех терапии [1, 2, 3].

Наиболее распространенный источник получения ГСК для аутооттрансплантации – периферическая кровь пациента [4]. Для этого больному выполняется медикаментозная мобилизация путем ежедневного введения колониестимулирующих факторов (КСФ), в результате чего происходит выход ГСК из костного мозга в периферическую кровь. Далее выполняется сбор ГСК с помощью операции лейкоцитафереза. Данные мероприятия продолжаются пока не будет получена трансплантационная доза ($>3 \times 10^6$ ГСК/кг [5]), достаточная для успешного восстановления кроветворения после химиотерапии.

Однако не у всех пациентов удается получить хороший ответ на медикаментозную мобилизацию и собрать трансплантационную дозу путем

лейкоцитафереза. Эти трудности связаны с динамикой выхода ГСК в периферическую кровь, весьма индивидуальной вследствие специфических изменений костного мозга в результате заболевания, предшествующего лечения и возраста пациента [6, 7, 8]. Выход ГСК в периферическую кровь у данных пациентов происходит на поздних сроках мобилизации. В итоге лейкоцитаферез выполняется иногда на 10 – 12 сутки и не всегда является результативным. Часто возникает необходимость в повторном лейкоцитаферезе на еще более поздних сроках медикаментозной мобилизации.

Между тем, периферическая кровь в поздние сроки медикаментозной мобилизации характеризуется значительным изменением клеточного состава. Данные изменения в периферической крови обусловлены фармакологическими свойствами препарата КСФ, который не только стимулирует пролиферацию и выход ГСК из костного мозга, но и их созревание, а также выход зрелых форм лейкоцитов из депо. Поэтому на поздних сроках мобилизации в периферической крови наблюдается значительный рост концентрации зрелых ядросодержащих клеток (ЯСК), которые обуславливают высокий лейкоцитоз полученного путем лейкоцитафереза трансплантационного материала. Такие ситуации, в том числе, возможны, если схема мобилизации не предполагала проведение предварительной цитостатической химиотерапии, и лейкоцитаферез выполнялся на фоне высоких концентраций ЯСК. В итоге концентрация ЯСК в продукте лейкоцитафереза может достигать $200 - 300 \times 10^9$ клеток/л, что, согласно мнению ряда авторов, обуславливает низкую сохранность ГСК в процессе замораживания [9]. Однако авторами не предлагаются пути решения данной проблемы, а причинно-следственная связь высокого лейкоцитоза с низкой сохранностью ГСК до сих пор не установлена. Между тем, разработка методов коррекции лейкоцитоза трансплантационного материала позволит улучшить сохранность ГСК. Персонализированный подход, учитывающий особенности трансплантата в каждом клиническом случае, обеспечит восстановление кроветворения у пациента в максимально короткий срок после трансплантации.

Цель исследования: Оптимизировать метод криоконсервации трансплантационного материала полученного из периферической крови при высоком лейкоцитозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки влияния гиперлейкоцитоза на сохранность ГСК проведен ретроспективный анализ результатов криоконсервации 166 образцов трансплантационного материала, полученного у 26 пациентов: с множественной

миеломой – 19, неходжкинскими лимфомами – 5, острыми лейкозами – 2. Всем пациентам на фоне полной или частичной ремиссии однократно вводился внутривенно циклофосфамид 4 г/м^2 площади поверхности тела. Через 5 суток назначалось ежедневное подкожное введение КСФ (филграстим) 10 мкг/кг фактической массы тела, включительно до завершения получения трансплантационного материала путем лейкоцитафереза. Полученный материал был подготовлен к хранению путем добавления криопротектора (55% ДМСО) в конечной концентрации ДМСО в трансплантате 7,5 %. Далее трансплантат подвергали замораживанию и хранению в жидком азоте.

Пробы для анализа концентрации ЯСК, количества и пролиферативного потенциала ГСК отбирались на этапах: до и после добавления криопротектора, а так же после размораживания трансплантационного материала. На данных этапах для оценки зависимости сохранности ГСК от концентрации ЯСК применялся корреляционный анализ.

Для апробации метода коррекции гиперлейкоцитоза выполнено проспективное исследование с использованием 21 образца трансплантационного материала с высокой концентрацией $150\text{--}370 \text{ ЯСК} \times 10^3/\text{мкл}$. В полученный путем лейкоцитафереза материал в асептических условиях добавлялась стерильная аутоплазма для снижения концентрации ЯСК ниже уровня $150 \times 10^3/\text{мкл}$.

Результаты клинической апробации (опытная группа, $n=21$) сравнивались с результатами, полученными до внедрения метода коррекции лейкоцитоза (контрольная группа, $n=166$). Для оценки достоверности различий между средними значениями в данных группах применялся параметрический критерий Стьюдента.

Анализ количества жизнеспособных ГСК и их колониеобразующей активности выполнялся до и после введения криопротектора, а так же после размораживания трансплантационного материала. Количество ГСК оценивалось на проточном цитометре с использованием протокола ISHAGE и заводского набора реагентов («Stem-Kit», Beckman Coulter, USA). Колониеобразующая активность ГСК оценивалась путем их культивирования в течение 14 суток на стандартизированных заводских средах (Methocult H4435 Enriched, Stemcell Technologies, Canada) с последующим подсчетом колоний. Концентрацию ЯСК определяли путем микроскопии в камере Горяева.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зависимость сохранности ГСК от концентрации ЯСК в лейкоконцентрате

В процессе медикаментозной мобилизации у всех пациентов была достигнута концентрация >10 ГСК/мкл периферической крови на 5 – 14 сутки. В соответствующие сроки выполнена процедура лейкоцитафереза. Полученный материал имел лейкоцитоз $46 - 370 \times 10^9$ ЯСК/л.

В результате исследования выявлено, что после введения ДМСО количество ГСК снизилось до $79 \pm 29\%$ от исходного значения, а колониеобразующая активность составила $88 \pm 25\%$. Установлено, что на этапе введения ДМСО сохранность количества ГСК и их колониеобразующей активности зависит от концентрации ЯСК в материале ($r_{\text{ГСК}} = -0,64$ и $r_{\text{КОЕ}} = -0,5$; $p < 0,01$). На рисунке 1 графически проиллюстрирован характер данной зависимости.

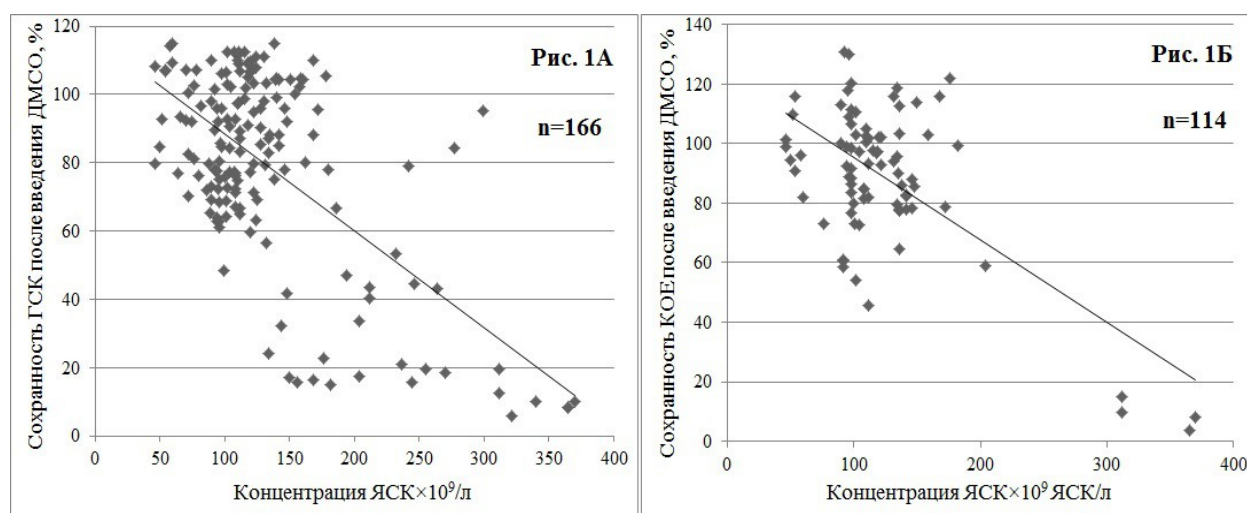


Рисунок 1. Зависимость сохранности ГСК (1А) и их колониеобразующей активности (1Б) от концентрации ЯСК после введения ДМСО в трансплантационный материал ($r_{\text{ГСК}} = -0,64$ при $n=166$; $r_{\text{КОЕ}} = -0,5$ при $n=114$; $p < 0,01$).

На рисунке 1 видно, что в отдельных случаях, когда клеточность трансплантата превышала 300×10^9 ЯСК/л, количество и функциональные свойства ГСК снижаются ниже 10% от исходных значений. Всего было зарегистрировано 27 (16%) случаев, когда после введения ДМСО сохранность ГСК составила менее 50% от заготовленной дозы. При этом данные лейкоконцентраты характеризуются лейкоцитозом $>150 \times 10^9$ ЯСК/л.

Полученные результаты подтверждают наблюдения других авторов, которые сообщали о низкой сохранности ГСК при криоконсервации трансплантатов с высоким лейкоцитозом [9]. Нами дополнительно установлено, что при высокой концентрации ЯСК в материале гибель ГСК происходит уже на этапе добавления ДМСО. Это было возможно

благодаря контролю качества трансплантата после добавления криопротектора. В тоже время другие авторы выполняли анализ качества только после размораживания – когда уже невозможно принять решение об отмене АутоТГСК, так как высокодозная терапия уже выполнена.

Анализ аналогичных параметров на этапе замораживания-оттаивания показал, что сохранность ГСК и их пролиферативный потенциал не зависят от концентрации ЯСК. На рисунке 2 видно, что значения параметров концентрации ЯСК и сохранности ГСК после размораживания трансплантата распределены независимо друг от друга.

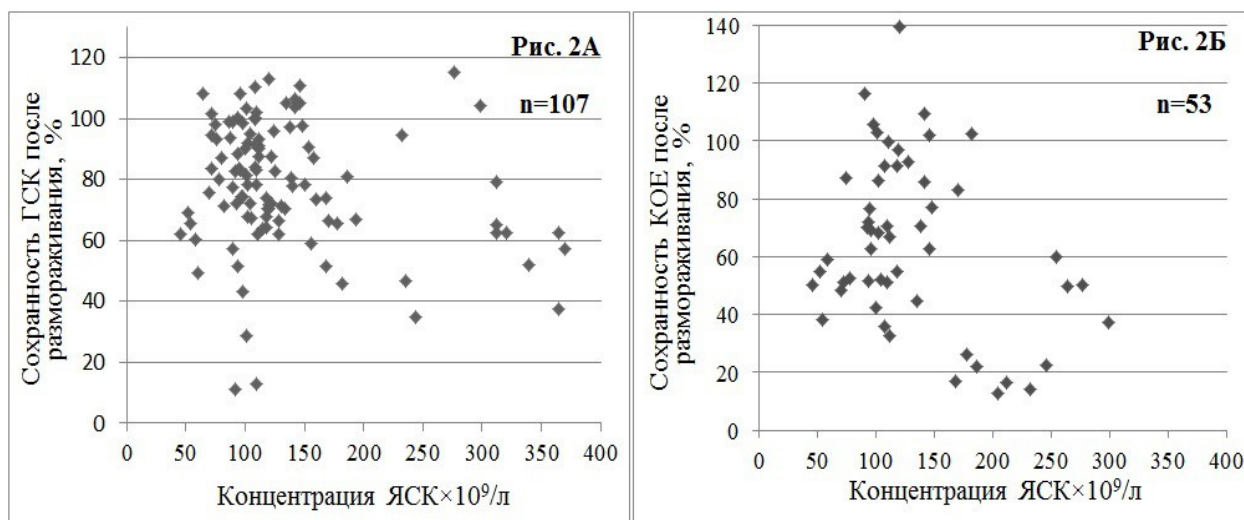


Рисунок 2. Зависимость сохранности ГСК (2А) и их колониеобразующей активности (2Б) от концентрации ЯСК после размораживания трансплантационного материала ($r_{\text{ГСК}} = -0,2$ при $n=107$; $r_{\text{КОЕ}} = -0,32$ при $n=53$).

Следовательно, концентрация ЯСК не влияет на сохранность количества ГСК и их способность к пролиферации в процессе замораживания-оттаивания.

В целом в процессе замораживания-оттаивания количество жизнеспособных ГСК снижается на 15%, а их пролиферативный потенциал – на 17%. Суммарно на этапе введения ДМСО и в процессе замораживания-оттаивания снижение количества ГСК составило 36%, а пролиферативного потенциала – на 29%. Столь значительное снижение трансплантационной дозы может быть причиной посттрансплантационных осложнений связанных с длительными сроками восстановления кроветворения. Поэтому целесообразна коррекция гиперлейкоцитоза лейкоконцентрата для уменьшения влияния данного фактора на сохранность ГСК на этапе введения ДМСО.

Метод коррекции лейкоцитоза и его апробация

Учитывая полученные результаты, нами предложена методика снижения лейкоцитоза путем добавления аутоплазмы к лейкоконцентрату перед введением ДМСО. Для расчета количества аутоплазмы, необходимого для снижения лейкоцитоза, ниже 150×10^9 ЯСК/л применялась формула:

$$V(\text{аутоплазмы}) = \frac{V(\text{исходного материала}) \times C(\text{ЯСК})}{150} - V(\text{исходного материала})$$

где V (аутоплазмы) – объем добавляемой аутоплазмы, мл;

V (исходного материала) – объем исходного материала, мл;

C (ЯСК) – концентрация ЯСК в исходном трансплантационном материале, ЯСК $\times 10^9$ /л;

150 – рекомендуемая концентрация ЯСК в трансплантационном материале, ЯСК $\times 10^9$ /л.

Представленные на рисунке 3 результаты апробации методики коррекции лейкоцитоза показали, что сохранность ГСК и их пролиферативный потенциал достоверно выше ($p < 0,05$), чем в случаях, проанализированных до начала апробации предложенного нами метода.

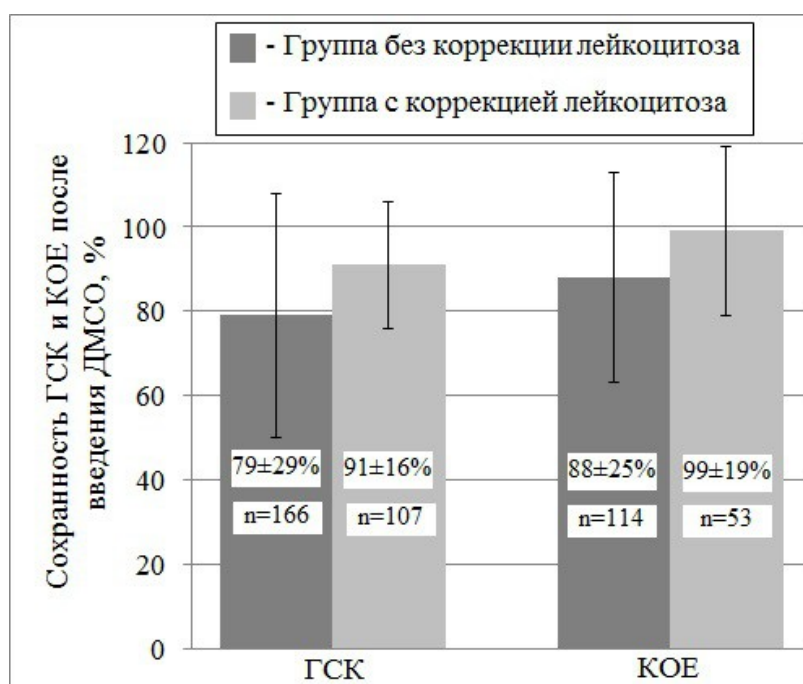


Рисунок 3. Результаты сравнения сохранности ГСК и КОЕ на этапе введения ДМСО до и после апробации метода коррекции лейкоцитоза. В группе без коррекции, лейкоцитоз составлял $150\text{--}370 \times 10^9$ ЯСК/л. В группе после коррекции лейкоцитозе, концентрация ЯСК $96\text{--}150 \times 10^9$ /л.

Таким образом, благодаря разработанному методу коррекции лейкоцитоза трансплантата удалось увеличить сохранность количества ГСК на 9% и их пролиферативного потенциала на 8%. Это стало возможно благодаря снижению лейкоцитоза до $96 - 150 \times 10^9$ ЯСК/л перед добавлением ДМСО.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что введение криопротектора в трансплантационный материал с высокой концентрацией ЯСК снижает сохранность ГСК. Таким образом, применение криопротектора ДМСО – это «палка о двух концах». С одной стороны криопротектор эффективно защищает ГСК на этапе замораживания-оттаивания, а с другой – еще на этапе его добавления в трансплантат происходит гибель клеток.

Известно, что способность ДМСО повреждать клетки зависит от его концентрации в трансплантационном материале. В исследовании А.А. Gurtuvenko, J. Anwar установлено, что при концентрациях ДМСО от 10 до 20%, помимо прогрессирующего истончения мембран, наблюдается формирование гидрофильных пор, которое начинается с того, что проникающие в бислой молекулы ДМСО нарушают взаимодействия между головными группами липидов и создают в мембране дефекты [10]. Эти дефекты заполняются молекулами воды, при этом, если количество молекул воды в гидрофобной области мембраны превышает определенное пороговое значение, происходит переориентация головных групп липидов внутрь мембраны с образованием поры. Данные наблюдения подтверждаются и в нашем исследовании. Так снижение количества жизнеспособных ГСК было результатом увеличения доли клеток с разрушенной мембраной, что фиксировалось с помощью витального красителя 7AAD, при выполнении проточной цитометрии. Таким образом, авторы утверждают, что при концентрации ДМСО в материале более 10% происходит разрушение липидного бислоя клеток.

Однако в нашем исследовании ДМСО вводился в материал из расчета его конечной концентрации, не превышающей 7,5%. Чем обусловлены описанные выше повреждения при данной концентрации ДМСО? Известно, что процесс проникновения ДМСО внутрь клеток происходит путем пассивной диффузии и растянут во времени [11]. В исследованиях Olagewaju O. на эмбриональных стволовых клетках установлено, что время уравнивания концентрации внутри и внеклеточного ДМСО после его добавления может составлять от 3 до 15 минут в зависимости от температуры [12]. Автор

выяснил, что чем больше продолжительность уравнивания концентрации внутри и внеклеточного ДМСО, тем ниже жизнеспособность клеток после добавления данного криопротектора. Аналогичные результаты были получены другими авторами на ГСК пуповинной крови [13].

Таким образом, можно объяснить, что некоторое время после добавления криопротектора все его количество распределяется только в межклеточном пространстве – в плазме. Нами рассчитано, что при концентрации ЯСК 300×10^9 ЯСК/л доля плазмы в трансплантате составляет менее половины от его объема. В таком случае начальная концентрация ДМСО первые минуты после его введения двукратно превышает планируемые 7,5%. Только после проникновения ДМСО в клетки и распределения по всему объему материала его концентрация снижается до планируемых 7,5%. Учитывая все вышесказанное, можно предположить, что ДМСО, вследствие своей высокой начальной концентрации в межклеточном пространстве, способен повреждать ГСК. Наиболее выражены данные повреждения при введении ДМСО в трансплантационный материал с высокой концентрацией лейкоцитов, что было продемонстрировано в нашем исследовании.

Клиническая апробация разработанного нами метода коррекции лейкоцитоза трансплантационного материала показала возможность увеличения сохранности ГСК. Внедрение данной методики позволит гарантировать трансплантационную дозу, необходимую для сокращения сроков депрессии кроветворения после высокодозной химиотерапии.

Следует учитывать, что предложенный подход предполагает добавление большого количества аутоплазмы, что увеличивает конечный объем трансплантата. В описанных в статье случаях коррекция лейкоцитоза путем добавления аутоплазмы привела к увеличению объема трансплантата на 37 – 89%. В свою очередь, столь значительное увеличение объема трансплантата не всегда приемлемо, так как осложняет последующую процедуру трансплантации. Большой объем сложнее трансплантировать – вместе с ГСК в организм пациента вводится больше продуктов гемолиза и криопротектора, что, по мнению некоторых авторов, обуславливает клинически значимые осложнения при трансплантации [14, 15, 16]. Поэтому данный метод коррекции приемлем, если исходный объем трансплантата имеет небольшой объем.

В заключение следует отметить, что часто продукт лейкоцитафереза содержит высокие концентрации ЯСК. Такие ситуации возможны, если схема мобилизации не

предполагала проведение предварительной цитостатической химиотерапии, и лейкоцитаферез выполнялся на фоне высоких концентраций ЯСК. Кроме того, такое возможно в случаях, если рост концентрации ГСК достигает приемлемых значений на поздних сроках проведения медикаментозной мобилизации, когда и концентрация лейкоцитов достигает высокого уровня. В любом случае необходимо особое внимание к данному лабораторному показателю при подготовке материала к хранению, так как гиперлейкоцитоз ведет к значимому снижению сохранности ГСК в процессе добавления ДМСО. Если лейкоцитаферез приходится выполнять на фоне высоких концентраций лейкоцитов в периферической крови, целесообразна заготовка аутоплазмы. При концентрации лейкоцитов в лейкопродукте выше $150 \times 10^9/\text{л}$ необходимо разведение лейкоконцентрата аутоплазмой для снижения данного параметра. Данный метод коррекции гиперлейкоцитоза наиболее прост. Однако необходимо учитывать, что дополнительное увеличение объема трансплантата допустимо, если его конечный объем не будет осложнять процесс трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolwell B.J., Pohlman B., Rybicki L. et al. Patients mobilizing large numbers of CD34+ cells ('super mobilizers') have improved survival in autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies // Bone Marrow Transplantation. – 2007. – Vol. 40 – P. 437-441.
2. Wahlin A., Eriksson M., Hultdin M. Relation between harvest success and outcome after autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma // European Journal of Haematology. – 2004. – Vol. 73, № 4. – P. 263-268.
3. Sola, C., Maroto P., Salazar R. Bone marrow transplantation: prognostic factors of peripheral blood stem cell mobilization with cyclophosphamide and filgrastim (r-metHuGCSF): the CD34+ cell dose positively affects the time to hematopoietic recovery and supportive requirements after high-dose chemotherapy // Hematology. – 1999. – Vol. 4. – P. 195-209.
4. Passweg J.R., Baldomero H., Bregni M. et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011 // Bone Marrow Transplantation. – 2013. – Vol. 48. – P.1161-1167.
5. Bensinger W., Appelbaum F., Rowley S.J. et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells // Clinical Oncology. – 1995. – Vol. 13, N 10. – P. 2547-2555.

6. Грицаев С.В., Кузьева А.А., Волошин С.В. и др. Заготовка трансплантата для аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным: частота и причины неудачных сборов // Российский Медицинский Журнал «Онкология». – 2013. – №1. – С. 30-36.
7. Mazumder A., Kaufman J., Niesvizky R. Effect of lenalidomide therapy on mobilization of peripheral blood stem cells in previously untreated multiple myeloma patients // Leukemia. – 2008. – Vol. 22. – P. 1280-1281.
8. Yang S.M., Chen H., Chen Y.H. et al. The more, the less: age and chemotherapy load are predictive of poor stem cell mobilization in patients with hematologic malignancies // Chinese Medicine journal. – 2012. – Vol. 125. – P. 593-598.
9. Liseth, K., Abrahamsen J.F., Bjorsvik S. et al. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft // Cytotherapy. – 2005. – Vol. 7. – P. 328-333.
10. Gurtuvenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide // J. Phys. Chem. B. – Sep., 2007 – Vol. 6. – N. 111. – P. 10453-10460.
11. Чуйко В.А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Проблемы криобиологии. – 1989. – №3. – С. 3-10.
12. Olarewaju O.O. Designing an optimal cryopreservation protocol for human embryonic stem cells: A systematic approach: A thesis submitted for the degree Master of Philosophy: Biochemistry / Oluseun Olushola Olarewaju. – University of York, Department of Biology. – 2010. – P. 236.
13. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. et al. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46 – P. 76-87.
14. 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.
15. 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, N 4. – P. 322-324.
16. 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, N 7). – P. 797-800.