

**КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ ДО И ПОСЛЕ
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ**

**Балашова В.А., Ругаль В.И., Бессмельцев С.С.,
Грицаев С.В., Волошин С.В., Кострома И.И., Шмидт А.В., Семенова Н.Ю., Кувшинов
А.Ю., Сельцер А.В., Чечеткин А.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства", 2-я Советская ул., д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 19102. Тел. (812) 274-66-40, e-mail: bloodscience@mail.ru

Резюме: Представлены данные о колониеобразующей способности гемопоэтических стволовых клеток мобилизованной периферической крови у пациентов с злокачественными лимфомами до криоконсервирования и после размораживания клеточной взвеси. Число колоний гемопоэтических стволовых клеток до криоконсервирования значимо превышало таковое после размораживания. Сделан вывод о возможном негативном влиянии афереза и/или криоконсервирования на стволовые клетки.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, колониеобразующая способность, злокачественная лимфома, криоконсервирование, аферез.

**COLONYFORMING CAPACITY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF
MOBILIZED PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH MALIGNANT
LYMPHOMAS BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION**

**Balashova V.A., Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Gritsaev S.V., Voloshin S.V., Kostroma I.I.,
Schmidt A.V., Semenova N. Yu., Kuvshinov A.Yu., Seltzer A.V.,
Chechetkin A.V.**

*Federal State Budget Institution Russian Research Institution of Hematology and Transfusiology
of Federal Medical Biological Agency, 2-ya Sovetskaya str., 16, Saint-Petersburg, Russian
Federation, 191024. Phone (812) 274-66-40, e-mail: bloodscience@mail.ru*

Date about colony forming capacity of hematopoietic stem cells of mobilized peripheral blood in patients with malignant lymphomas before cryopreservation and after thawing of cell suspension and following transplantation have been shown. Colonies number of hematopoietic stem cells prior cryopreservation veraciously exceeds one after thawing of transplant. It is possible there is negative apheresis and cryopreservation effect on stem cells.

Key words: hematopoietic stem cells, colony forming capacity, malignant lymphoma, apheresis, cryopreservation.

Введение

Заболевания лимфоидной ткани, объединенные названием – злокачественные лимфомы (ЗЛ), представляют собой гетерогенную группу опухолевых состояний лимфопоэза. ВОЗ-классификация лимфоидных неоплазий выделяет неходжкинские В-клеточные и Т/НК-клеточные опухоли (НХЛ) и лимфогранулематоз – болезнь или лимфома Ходжкина (ЛХ), которая чаще всего является следствием злокачественной трансформации В-лимфоцитов герминальных центров фолликулов лимфатических узлов. ЗЛ обусловлены злокачественной клональной пролиферацией клеток лимфоидной системы. Классификация ЗЛ включает в себя более 60 наименований, относящихся к В-или Т-клеточным вариантам. Средний возраст больных - 60 лет.

Современная терапия больных ЗЛ включает в себя, среди прочих методов, использование высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией

аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК) на этапе консолидации ремиссии [1]. АутоТГСК может быть результативным методом терапии, особенно если у пациента сохраняется чувствительность к химиопрепаратам, и он находится в полной ремиссии во время трансплантации [2]. АутоТГСК рекомендована также больным ЗЛ с неблагоприятным прогнозом, в то время как трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) может быть зарезервирована как терапия спасения для пациентов с рецидивом после Ауто-ТГСК [3;4]. Основным противопоказанием для аутоотрансплантации больным ЗЛ является доказанная химиорезистентность во второй линии терапии.

Предложенные EBMT [5] рекомендации к применению АутоТГСК больным ЗЛ базируются на типе лимфомы, стадии заболевания (первая или вторая ремиссия, рецидив), возрасте больного, химиорезистентности или химиочувствительности пациента [2].

Одним из основных источников ГСК для аутоотрансплантации является периферическая кровь больного, обогащенная стволовыми клетками в результате мобилизации их из костного мозга (мобилизованная периферическая кровь – МПК).

Существуют различные режимы мобилизации ГСК из костного мозга, после чего обогащенная CD34-клетками периферическая кровь подвергается аферезу. Продукт афереза представляет собой клеточную взвесь, в которой значительная часть принадлежит лимфоцитам и моноцитам, среди которых находятся ГСК. От успешной процедуры мобилизации, количества, качества и функции СК зависит успех трансплантации - восстановление гемопоэза.

Для мобилизации ГСК используют винорелбин, циклофосфамид, вепезид, плериксафор и другие препараты в виде монотерапии или в комбинации.

В качестве маркера ГСК используют антиген CD34 как критерий качества и пригодности трансплантата. Количество CD34+клеток в МПК определяют методом проточной цитофлуориметрии. От дозы перелитых CD34+ клеток зависит успешность трансплантации и сроки восстановления гемопоэза [6-8]. Однако, эффективность пересадки клеток зависит также в значительной степени от функциональной активности CD34+ клеток, показателем которой является колониеобразующая способность (КОС) гемопоэтических стволовых клеток [9-11].

Открытие способности ГСК в условиях *in vivo* восстанавливать гемопоэз сублетально облученных мышей, а в условиях *in vitro* формировать клеточные колонии, которые являются производными CD34+ стволовых клеток, имело огромное значение в

экспериментальной и клинической медицине [12; 13]. Культивирование ГСК с целью изучения их колониеобразующей способности, то есть числа колониеобразующих единиц (КОЕ) в единице объема исследуемого материала, позволяет определять пролиферативный потенциал кроветворного пула. В условиях краткосрочной 14-дневной культуры возможно изучать прогениторные ГСК, находящиеся между плюрипотентными и коммитированными СК. Число КОЕ эритро- и гранулоцитарных клеточных линий (КОЕ-Г, КОЕ-Э) в трансплантате показывает количество репопулирующих ГСК и их пролиферативный потенциал.

Целью нашего исследования являлось изучение колониеобразующей способности ГСК мобилизованной крови до криоконсервирования и после размораживания у больных злокачественными лимфомами.

Материал и методы

Материалом для исследования послужила клеточная взвесь продукта афереза периферической крови 25 больных: 17 больных НХЛ и 8 больных ЛХ до криоконсервирования и после размораживания клеточной взвеси. Ранее были изучены также образцы аферезного продукта от 7 здоровых доноров ГСК [10].

Для сбора ГСК после мобилизации крови осуществляли аферезы на сепараторах клеток крови Hemonetics MCS9000 и Cobe Spectra (Version 6.1). В процессе каждого афереза обрабатывали 2,5 объема циркулирующей крови. Неудачными считали сборы, когда количество CD34⁺ клеток в аферезном продукте было менее $2,0 \times 10^6/\text{кг}$. В качестве криопротектора был использован 20% раствор диметилсульфоксида, приготовленного *ex tempore* с применением аутологичной плазмы. Клеточную взвесь смешивали с криопротектором в соотношении 1:1 (конечная концентрация криопротектора – 10%) и переводили 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°C до -20°C со скоростью 1°C/мин, 2-й этап – с -20°C до -40°C со скоростью 2°C/мин, 3-й этап – с -40°C до -80°C со скоростью 4°C/мин, 4-й этап – с -80°C до -140°C со скоростью 20°C/мин. После этого контейнеры с клеточной взвесью хранили в парах азота при температуре -140°C. Размораживание взвеси осуществляли на водяной бане при температуре 39°C.

Метод культивирования клеток в полутвердой среде на основе метилцеллюлозы

Для культивирования клеток была использована культуральная среда MethoCult H 4435 (Stem cell Technologies) – полная среда на основе метилцеллюлозы. Она способна поддерживать рост эритроидных, гранулоцито-моноцитарных, макрофагальных, мультилинейных и других колоний и содержит все необходимые для этого ростовые факторы, включая фактор стволовых клеток, интерлейкины 3 и 6, колониестимулирующий фактор для грануло-моноцитопоэза, эритропоэтин и другие [14].

Полученная путем сепарации клеточная взвесь содержит мононуклеары и клетки нейтрофильного ряда. Клетки в количестве 1×10^5 помещали в составе 1,0 мл полной среды MethoCult H 4435 в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм. Чашки Петри размещали в CO_2 -инкубаторе во влажной среде при температуре $+37^\circ\text{C}$. Колониеобразующую способность заготовленных ГСК оценивали по результатам 14-дневного культивирования.

Гемопоэтические стволовые клетки выявлялись по их способности формировать колонии, каждая из которых является клоном от материнской ГСК. Под микроскопом определялась принадлежность колоний к эритроидному или гранулоцито-моноцитарному ряду и их качественные характеристики. Подсчет включал эритроидные колонии, образованные бурстобразующими единицами эритропоэза (БОЕ-Э); гранулоцитарные колонии, сформированные колониобразующими единицами гранулоцитопоэза (КОЕ-Г); колонии гранулоцито-моноцитарные (КОЕ-ГМ); колонии мультилинейные, содержащие эритроидные, гранулоцитарные, моноцитарные и мегакариоцитарные клетки (КОЕ-ГЭММ); макрофагальные колонии (КОЕ-Макроф).

Полученные данные обрабатывали статистическими методами (критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни при $p < 0,05$) с помощью программ Microsoft Excel и Statistica-6 for Windows.

Результаты

В исследовании представлены результаты определения колониобразующей способности ГСК мобилизованной периферической крови 25 больных (17 больных НХЛ и 8 больных ЛХ) до и после криоконсервирования. Из таблицы 1 видно, что общее число колоний на 1×10^5 клеток аферезного продукта до криоконсервирования значительно превышало таковое после размораживания трансплантата. Наблюдалось равномерное

снижение числа колоний эритроидной и грануломоноцитарной ориентации в сравнении с исходными показателями КОС ($p < 0,05$).

Таблица 1. Колониеобразующая способность ГСК мобилизованной периферической крови больных ЗЛ до криоконсервирования и после размораживания

КОС гемопоэтических стволовых клеток	Число колоний на 1×10^5 клеток				
	Общее число колоний	БОЕ-Э	КОЕ-ГМ	КОЕ-ГЭММ	КОЕ-Макроф
До криоконсервирования (n=25)	396,0	194,0	150,0	11,2	14,7
После размораживания (n=25)	183,0	94,0	78,5	6,3	6,95
Здоровые доноры ПСК (n=7)	367,0	173,0	168,0	12,4	13,4
<i>p</i> (уровень значимости различий между группами: до криоконсервирования и после размораживания)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Общее число колоний на 1×10^5 клеток у больных НХЛ и ЛХ до криоконсервирования составило 384,8 и 334,6 соответственно. Различие статистически недостоверно ($p \geq 0,05$). Сравнение показателей КОС клеток-прекурсоров МПК у больных ЗЛ до криоконсервирования и у здоровых доноров не выявило значимых различий ($p \geq 0,05$).

В предыдущем исследовании [10] мы оценивали КОС гемопоэтических стволовых клеток мобилизованной крови до и после криоконсервирования у 50 больных множественной миеломой (ММ). Общее число колоний на 1×10^5 клеток до криоконсервирования клеточной взвеси у больных ММ составило 384,0; число БОЕ-Э – 184,0, число КОЕ-ГМ – 156,0.

Таким образом, значимых различий между этими показателями у больных ЗЛ, ММ и здоровых доноров не было выявлено. Эти результаты свидетельствуют о достаточно высокой эффективности мобилизации и афереза клеток у больных обеих групп, несмотря

на предшествующую специфическую терапию, при том, что можно было ожидать более низкую КОС гемопоэтических стволовых клеток у больных ЗЛ ввиду более интенсивной химиотерапии и более агрессивного курса цитостатической терапии, предшествующей заготовке АутоТГСК.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значимом снижении количества колониеобразующих клеток в аутотрансплантате, полученного методом афереза из периферической крови, после его размораживания. Важно отметить, что приживление трансплантированных клеток было констатировано в среднестатистические сроки у всех больных. В посттрансплантационном периоде также не было зафиксировано и увеличения потребности в трансфузиях эритроцитарной массы и тромбоконцентрата.

Возможно, что гибель значительного числа кроветворных клеток после размораживания клеточной взвеси обусловлена преимущественно повреждающим воздействием цитостатических препаратов, назначаемых в период, предшествующий заготовке трансплантата. Повреждение клеточных мембран свободными радикалами кислорода, в избытке образующимися при химиотерапии, делает кроветворные клетки чувствительными к процессу кристаллизации при замораживании и к перепаду температур, имеющему место во время размораживания [15]. Следует учитывать также состояние гемопоэтической ниши, морфофункциональный статус которой нарушается при гемобластозах [16; 17]. Не исключено, что негативное воздействие отдельных цитостатических препаратов опосредовано значительной суммарной дозой препарата вследствие длительного периода, необходимого для достижения ответа. Тем самым следует предположить, что для больных ЗЛ, являющихся потенциальными кандидатами на АутоТГСК уже на этапе диагностики заболевания, оправданной представляется интенсивная индукционная терапия, что позволит планировать выполнение АутоТГСК в ранние сроки.

Ранее авторами [10] были опубликованы данные о существенном снижении количества КОЕ после размораживания клеточной взвеси и у больных множественной миеломой. Совокупность результатов двух исследований дает основание высказать предположение о необходимости пересмотра субоптимального уровня CD34+ клеток в аутотрансплантате больных хроническими лимфопролиферативными заболеваниями в сторону его увеличения. Дополнительным обоснованием целесообразности такого шага

могут послужить данные, которые планируется получить при сопоставлении количества КОЕ и CD34+ клеток в продукте афереза.

Особое внимание, уделяемое проблеме заготовке трансплантата у больных ЗЛ, обусловлено высокой частотой неудачных мобилизаций ГСК из костного мозга в периферическую кровь. Следует предположить, что оптимальным режимом мобилизации у этой категории больных может быть комбинация не только с обязательным назначением высокодозного циклофосфана (3-4 г/м²) и Г-КСФ, но и плериксафора. Не исключено, что эффективным может быть включение других ростовых факторов: эритропоэстимулирующих препаратов и агонистов рецептора тромбопоэтина.

Таким образом, полученные данные позволяют сформулировать положение для дальнейших исследований. Это модификация режимов мобилизации посредством включения плериксафора и дополнительных ростовых факторов. Другое направление – снижение интенсивности индукционных режимов путем включения в их состав новых таргетных препаратов. Предполагается также выполнение комплексного анализа результатов культуральных исследований и данных иммунофенотипирования с целью обнаружения (или не обнаружения) ассоциации между уровнем CD34+ клеток в аутооттрансплантате и количества колоний *in vitro*.

Литература

1. Абдулкадыров К.М. Клиническая гематология. Справочник. – Изд-во: Питер, 2006. – 448 с.
2. Schouten H.C., Sureda A. HSCT for non-Hodgkin's lymphoma // The EBMT Handbook. 6 Edition. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. – 2012. – P. 414-429.
3. Bastion Y., Brice P., Haioun C. et al. Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor-prognosis follicular lymphoma // Blood. – 1995. – Vol. 86. – P. 3257-3262.
4. Van Kampen R.J., Canals C., Schouten H.C. et al. Allogenic stem-cell transplantation as salvage therapy for patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma relapsing after an autologous stem-cell transplantation: an analysis of the European

Group for Blood and Marrow Transplantation Registry // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29, No.10. – P. 1342-1348.

5. Haemopoietic stem cell transplantation // The EBMT Handbook. 6 revised editions. – 2012. – P.419-431.

6. Покровская О.С., Менделеева Л.П., Гальцева И.В. и др. Мобилизация гемопоэтических клеток крови у больных миеломной болезнью // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2 003. - № 2. – С.55.

7. Haizmann M., o'Meara A.C., Moosmann P.R. et al. Efficient mobilization of PBSC with vinorelbine/G-CSF in patients with malignant lymphoma // Bone Marrow Transplantation. – 2009. – Vol. 44. – P. 75-79.

8. Haverkos B.M., McBride A., O'Donnell L. et al. An effective mobilization strategy for lymphoma patients after failed upfront mobilization with plerixafor // Bone Marrow Transplantation. – 2014. – Vol.49. – P. 1052-1055.

9. Алексеев С.М. Оценка факторов, влияющих на эффективность мобилизации гемопоэтических стволовых клеток периферической крови при трансплантации: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Санкт-Петербург. – 2009. – 18 с.

10. 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. – Т.17, №4. – С. 63-69.

11. Bargetzi M.J., Passweg J., Baertschi E. et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells with vinorelbine and granulocyte colony-stimulating factor in multiple myeloma patients is reliable and cost effective // Bone Marrow Transplantation. – 2003. – Vol. 31. – P. 99-103.

12. Bryder D., Rossi D.I., Weissman I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue specific stem cell // American Journal of Pathology. – 2006. – Vol. 169. – P. 338-346.

13. Wodnar-Filipowicz. A. Biological properties of hematopoietic stem cells // The EBMT Handbook. 6 Edition. Haematopoietic Stem Cell Transplantation. – 2012. – P. 61-72.

14. Samaras P., Pfrommer S., Seifert B., et al. Efficacy of vinorelbine plus granulocyte colony-stimulation factor for CD34+ hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2015. – Vol. 21. – P. 74-80.

15. Goltzev A.N., Babenko N.N., Dubrava T. G. et al. Modification of the state of bone marrow hematopoietic cells after cryopreservation // International Journal of Refrigeration. – 2006. – Vol. 29. – P. 358-367.
16. Ругаль В.И. Дефект гемопоэтической ниши – ключевой фактор становления гемобластозов // Вестник гематологии. – 2012. - №4. – С.32-33.
17. Nissen-Druey C., Tichelli A., Mayer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease // Acta Haematologica. – 2005. – Vol. 113. – P. 5-96.