

Principiile generale ale transplantului de celule stem hematopoietice. Rolul laboratorului clinic în obținerea unui grefon de celule stem hematopoietice de calitate

General Principles of Haematopoietic Stem Cell Transplantation. The Role of the Clinical Laboratory in High Quality Grafts Harvesting

Andreea Delia Moicean^{*}, Adriana Mariana Dumitrescu, Tatiana Pușcariu, Georgeta Nițu, Dana Ostroveanu, Mihaela Camelia Ghiță, Virginia Nicoleta Mirea, Dan Nicolae Coliță

Centrul de Hematologie și Transplant Medular “Ștefan Berceanu”, Institutul Clinic Fundeni, București, România

Rezumat

Succesul transplantului de celule stem hematopoietice (TCSH) depinde de sensibilitatea celulei maligne la citostatice și de calitatea grefonului administrat. Un grefon de celule stem hematopoietice de calitate este un grefon steril care conține cel puțin $2,5 \times 10^6/\text{kgc}$ celule stem CD34^+ viabile și funcționale. Pentru obținerea lui, o echipă de transplant de celule stem hematopoietice are nevoie de laboratoare experimentate în domeniul citometriei în flux, culturilor de celule hematopoietice, citomorfologiei și microbiologiei. În Centrul de Hematologie și Transplant Medular din Institutul Clinic Fundeni, au fost obținute 47 grefoane de celule stem hematopoietice din sângele periferic din 96 afereze efectuate la 38 pacienți și 9 donatori sănătoși. Procedura utilizată constă din: administrarea programului de mobilizare, determinarea zilnică a numărului de leucocite, determinarea numărului de celule stem CD34^+ mobilizate în sângele periferic prin citometrie în flux, recoltarea grefonului, prelucrarea grefonului în vederea conservării și testarea lui din punct de vedere calitativ in vitro, criocongelarea programată cu azot lichid și crioconservarea grefonului. Pentru realizarea pragului de $2,5 \times 10^6/\text{kgc}$ celule CD34^+ au fost necesare 1 - 3 recoltări per pacient. Viabilitatea obținută la testul direct a fost de 94 - 99% imediat după recoltare. Testarea in vitro a evidențiat $39 - 1074 \times 10^4$ colonii GM-CSF /kgc/probă. Examenle bacteriologice au fost negative în toate probele recoltate. Hemograma din grefon, ca și testele de bacteriologie, viabilitate, citometrie în flux și culturi de celule hematopoietice au fost repetate la decongelarea grefonului, înainte de administrare la pacient. Au fost administrate 43 grefoane, cu refacerea hematopoiezei în 7-15 zile.

Cuvinte cheie: transplant de celule stem hematopoietice, citomorfologie, citometrie în flux, culturi de celule stem hematopoietice.

^{*} **Adresa pentru corespondență:** Andreea Delia Moicean, Aleea Sinaia 8, bl.73, apt.16, Sector 2, 022763 București,
Telefon 0723 254 064; e-mail: deliadi@xnet.ro

Abstract

The success of the haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) depends on both the sensitivity of the malignant cells to chemotherapy and the quality of the graft. A high quality HSC graft that can ensure the recovery of the immune system and haematopoiesis must be sterile and must provide at least 2.5×10^6 CD34+ positive cells /kg of recipient weight. The achievement of such a graft needs a team work between the HSCT group and performing laboratories. In the Center of Haematology and Bone Marrow Transplantation, Fundeni Clinical Institute, between March 2000 and December 2005, 47 grafts were collected with peripheral blood aphaeresis from 38 patients and 9 healthy donors. The following procedures were used: stem cell mobilization program, daily white blood cells (WBC) count, cytometry blood count of CD34+ stem cells, graft collecting, graft preparation for preservation and in vitro quality tests, cryopreservation in liquid nitrogen. In order to obtain 2.5×10^6 CD34+ stem cells /kg recipient weight, 1 to 3 aphaeresis were required. The cell viability just after harvesting tested by direct means, was 94-99%. In vitro cell cultures showed $39 - 1074 \times 10^4$ colonies GM-CSF /kg weight/sample. Microbiological screening tests were negative for all samples. Before graft infusion, cell counting, viability tests, flow cytometry and stem cell cultures were repeated. 30 grafts were infused with the recovery of the haematopoiesis in 7-15 days.

Key words: haematopoietic stem cell transplantation, cytomorphology, flowcytometry, haematopoietic stem cell culture.

Transplantul de celule stem hematopoietice este terapia standard cu intenție curativă pentru leucemii acute și cronice, limfoame maligne inclusiv mielom multiplu și sindroame de insuficiență medulară dobândite sau înnăscute. Transplantul de celule stem hematopoietice este definit de EBMT (Grupul European de Transplant de Măduvă și Sânge) drept perfuzia de celule stem hematopoietice administrată unui pacient după un regim de condiționare cu intenția de a înlocui hematopoieza existentă de către celulele injectate¹. În arsenalul terapeutic actual al multor afecțiuni ale celulei stem hematopoietice procedura de transplant este considerată cea mai bună obținere terapeutică, fără a fi nici pe departe o procedură excepțională¹. Transplantul de celule stem hematopoietice (TCSH) este un tratament fundamental pentru o multitudine de boli severe congenitale sau dobândite ale sistemului hematopoietic, ca și pentru boli maligne chimio- sau radiosensibile². Indicațiile majore ale transplantului de celule stem hematopoietice (TCSH), după coeficientul de variație (CV) a numărului de TCSH efectuate la 10 milioane de locuitori în ultimul deceniu, conform ultimului raport al EBMT sunt: leucemii acute și cronice,

boala Hodgkin, limfoame nonhodgkiniene și mielomul multiplu (Tabelul 1)¹.

Procedura de transplant de celule stem hematopoietice presupune un regim terapeutic mieloablative sau nonmieloablative urmat de administrarea grefonului (a transplantului). Regimul de condiționare mieloablative conține agenți chimioterapici convenționali utilizați în doze mari ("mieloablative"), combinați sau nu cu radioterapie și are drept scop eradicarea bolii maligne și crearea spațiului hematologic în care celulele stem administrate din grefon să se cuibărească, iar prin diviziuni succesive și dezvoltare să refacă hematopoieza pacientului respectiv. Toate combinațiile terapeutice mieloablative determină o profundă imunodeficiență celulară și umorală a primitorului. Această imunodeficiență persistă până când celulele stem și limfocitele mature din grefon repopulează și reconstituie sistemul limfopoietic și hematopoietic al primitorului. Regimul de condiționare nonmieloablative conține agenți cu acțiune puternic imunosupresoare, utilizați în doze convenționale și are drept scop crearea unui spațiu "imunologic" care să permită celulelor stem din grefon să se multiplice și să se dezvolte fără a

trezi reacții imune ca urmare a diferențelor antigenice între grefon și gazda care să ducă la compromiterea transplantului.

Caracteristica fundamentală a TCSH în raport cu transplantul de organe este aceea că grefa este un concentrat de celule progenitoare obținut prin tehnici specifice, care trebuie menținute vii și perfect funcționale până la administrarea lor bolnavului. Administrarea grefonului de celule stem hematopoietice se poate face la câteva zile, la câteva luni sau câțiva ani de la recoltare. Dacă administrarea grefonului se face mai târziu de 24 - 48 de ore de la recoltare, grefonul este congelat programat în vapori de azot și păstrat în azot lichid la -180°C . Închegarea celulelor stem hematopoietice fără riscul distrugerii lor prin cristalizarea apei din compoziție constituie elementul tehnic cel mai important și mai sensibil al programului de transplant⁶.

După decongelare, celulele progenitoare colectate se administrează bolnavului în perfuzie. Pentru reușita grefei este necesară perfuzarea a minimum 2,5 milioane de celule progenitoare vii pentru fiecare kilogram de greutate corporală.

În bolile hematologice maligne, utilizarea TCSH convențional permite oncohematologilor să administreze bolnavului doze foarte mari de medicamente citostatice, asociate sau nu cu iradierea totală corporală, în intenția de a eradica infimul procentaj de celule tumorale care au supraviețuit tratamentului inițial al bolii ("boala minimă reziduală") și care pot conduce la recădere. Aceste tratamente ar fi fatale în absența unei grefe reușite de celule progenitoare și, de aceea, calitatea biologică a grefonului reprezintă cheia de boltă a procedurii. În procedura de TCSH nonmieloablative, eradicarea bolii minime reziduale este realizată prin distrugerea celulelor tumorale restante în urma reacțiilor imune de citotoxicitate față de celulele gazdei ale limfocitelor donatorului infuzate odată cu grefonul (celulele tumorale exprimă antigenele gazdei).

După tipul donatorului, TCSH poate fi realizat prin două modalități tehnice de grefare: cu celule recoltate de la un donator compatibil, "potrivit" în ceea ce privește antigenele tisulare majore de histocompatibilitate (HLA) realizându-se allogrefa sau allotransplantul și cu celule

Tabelul 1. Clasificarea indicațiilor TCSH după CV

CV	TCSH allogen	TCSH autolog
< 50	LAM RC 1 sau nu RC1 LAL RC 1 sau nu RC1 LMC FC 1 sau nu FC1 SMD LNH	MM BH LNH
58 - 80	MM LLC	LAM RC1 LAM nu RC1
> 80	BH	LAL RC1 sau nu RC1 LMC FC1 sau nu RC1 SMD LLC

LAM = leucemie acută mieloblastică; LAL = leucemie acută limfoblastică; LMC = leucemie mieloidă cronică; SMD = sindrom mielodisplazic; LNH = limfom ne Hodgkinian; MM = mielom multiplu; LLC = leucemie limfatică cronică; BH = boala Hodgkin; RC1 = prima remisiune completă; FC1 = prima fază cronică. CV = coeficient de variație a indicației. Un CV mic denotă uniformitate de păreri în ceea ce privește indicația de transplant pentru boala respectivă.

prelevate chiar de la bolnav, într-un moment de remisiune a bolii maligne, realizându-se autogrefa sau transplantul autolog. Fiecare din aceste metode are indicații specifice, beneficii, avantaje și riscuri. În comparație cu allogrefa, în transplantul autolog, complicațiile inerente care apar până la revenirea la normal a funcțiilor măduvei osoase (riscul de hemoragii, infecțiile severe, anemia) sunt mult mai puțin grave și durează mai puțin, ceea ce conduce la o mortalitate legată de metodă mult mai mică.

În privința bolnavilor care pot fi supuși procedurii de TCSH, aceștia pot fi copii și adulți până la vârsta de 55 de ani (sau, excepțional, peste), cu condiția ca aceștia să nu aibă infecții active și să prezinte o stare fizică bună, care să le asigure depășirea complicațiilor legate de transplant. Este obligatoriu pentru includerea în procedură, ca boala de bază să fi fost în prealabil bine controlată de terapia convențională cu medicamente anticanceroase (citostatice), sau altfel spus, boala să fie în remisiune completă.

Celulele stem hematopoietice prezintă trei valențe biologice: capacitate de autoreplicare, capacitate de diferențiere și capacitate de migrare și "homing" în structurile care oferă condiții optime de multiplicare și diferențiere. Celulele stem hematopoietice care constituie grefonul de celule stem hematopoietice sunt o minoritate de celule din măduva osoasă (mai puțin de 1% din numărul total al celulelor din acest organ). Ele pot fi identificate prin markerul de suprafață care reacționează cu anticorpii anti-CD34. La individul normal, celulele stem hematopoietice asigură formarea și menținerea în funcție a tuturor celulelor care compun sângele (eritrocite, leucocite, trombocite și celule ale seriei limfocitare). Prin capacitatea de autoreplicare, celulele stem hematopoietice sunt diferite de progenitorii hematopoietici comutați care păstrează doar un potențial restricționat de dezvoltare³. Migrarea se face prin pasaj sanguin, ocazie cu care celulele stem pot fi identificate în sângele periferic în fracțiunea celulelor

mononucleare, de unde pot fi recoltate prin citaferază. În condiții bazale doar un foarte mic număr de celule stem hematopoietice circulă în sânge (0,5 - 5 celule CD34+/mmc). În 1976, Richman și col. au observat fenomenul de creștere a numărului de celule circulante formatoare de colonii (CFC) în timpul refacerii din leucopenia indusă de ciclofosamidă⁴. S-a demonstrat ulterior o creștere a numărului celulelor CD34+ din sângele periferic după chimioterapie de 14 ori. Astfel a apărut ideea mobilizării celulelor stem hematopoietice mediată de chimioterapie⁵. Administrarea de citochine cum ar fi factorul de creștere al coloniilor granulocitare (G-CSF) duce la o creștere marcată (de 56 de ori) a numărului de celule stem hematopoietice circulante CD34+^{3,30}. Față de metoda stimulului unic (fie chimioterapia, fie factori de creștere), metoda care combină stimularea prin chimioterapie în tandem cu factori de creștere hematopoietici, crește de 278 de ori numărul celulelor stem circulante din sângele periferic și, implicit, cantitatea recoltată. În plus, în oncohematologie, concentratul de celule stem hematopoietice periferice obținut după stimulare combinată cu chimioterapie și factori de creștere este mai puțin contaminat cu celule tumorale. Colectarea celulelor stem circulante se face prin citaferaza celulelor mononucleare din sânge cu ajutorul unui separator celular în flux continuu sau discontinuu. Citaferaza poate fi repetată zilnic, cu condiția administrării zilnice a factorului de creștere hematopoietic.

Calitatea materialului biologic obținut prin citaferază este apreciată prin: conținutul de celule mononucleare ($\times 10^8$), prin conținutul de celule CD34 pozitive ($\times 10^6$) și prin conținutul de celule ($\times 10^4$) capabile să formeze in vitro unități granulo-monocitare (CFU-GM), fiabilitatea parametrilor enumerați fiind progresivă.

Procedura utilizată în Centrul de Hematologie și Transplant Medular din Institutul Clinic Fundeni constă în următoarele etape:

1. Administrarea unui regim de polichimioterapie (Dexametazonă + Cytosar + Cisplatin sau

Endoxan în doză mare sau Ifosfamida + Epirubicină + Dexametazonă) urmat de factori de creștere (G-CSF) pentru mobilizarea celulelor stem CD34+ de la pacienți, în vederea recoltării autogrefonului pentru transplant. Pentru recoltarea grefonului de la donatorul sănătos în vederea allotransplantului se utilizează un program de mobilizare doar cu factori de creștere (G-CSF).

2. Monitorizarea mobilizării celulelor stem în sângele periferic prin urmărirea zilnică a numărului de leucocite. Obişnuit, după chimioterapie, pacientul prezintă o scădere progresivă a numărului de leucocite prin scăderea numărului de neutrofile, cu un nadir între zilele 7–12, în funcție de durata chimioterapiei din programul de mobilizare utilizat (în ziua 5 - 8 de administrare de factori de creștere). Ieșirea din această neutropenie se face exploziv cu leucocitoză în ziua 11 – 14 a programului de mobilizare (ziua 8 – 10 de administrare de factori de creștere). La donatorul sănătos și, uneori, la donatorul pacient, în primele 24 – 48 de ore de la administrarea primei doze de factori de creștere se constată o leucocitoză importantă cu neutrofilie, ca urmare a efectului secundar al G-CSF de demarginație și mobilizare din depozite a neutrofilelor. La donatorul sănătos, leucocitoza datorată mobilizării celulelor stem hematopoietice din măduvă în sângele periferic nu apare mai devreme de ziua 4 – 5 de administrare a factorului de creștere granulocitar. Odată cu mobilizarea celulelor stem hematopoietice din măduvă în sângele periferic, mononuclearele din formula leucocitară (limfocite + monocite) sunt în procent de 40 – 50%. O ușoară creștere a numărului de reticulocite din sângele periferic este inconstantă și fără semnificație. Switch-ul formulei leucocitare corespunde concentrației maxime în sângele periferic a celulelor stem hematopoietice mobilizate și momentului celui mai potrivit pentru o afereză cu randament maxim de recoltare. În zilele următoare, în sângele periferic sunt identificate, pe criterii morfologice, celulele precursorale granulocitului neutrofil

(mieloblast, promielocit, mielocit, metamielocit) cu reducerea treptată a procentului de mononucleare.

3. La depășirea pragului de 1000 leucocite/mmc, monitorizarea mobilizării celulelor stem în sângele periferic prin numărarea celulelor CD34+ în sânge cu ajutorul citometrului în flux;

4. Recoltarea grefonului de celule stem CD34+ începe atunci când numărul de celule CD34+ din sângele periferic depășește $10 - 15 \times 10^6/L$. Procedura de recoltare constă în afereza cu separator Haemonetics MCS+. Pentru un randament adecvat al procedurii, pacientul trebuie să prezinte o cale venoasă de acces cu un debit de cel puțin 30ml/min (vena jugulară internă, vena femurală sau vena subclavie). Pacientul este conectat la aparat prin intermediul unui sistem închis de tuburi de unică utilizare. Obişnuit, volumul prelucrat zilnic este de 10 litri de sânge (30-80ml/min), utilizând drept anticoagulant soluție de citrat ACD-A, în proporție de 1:12. În funcție de numărul de celule stem CD34+ recoltate printr-o afereză, procedura se repetă până la obținerea grefonului dorit. La 8 pacienți și la 5 donatori sănătoși s-a obținut un grefon de $> 3 \times 10^6$ celule CD34+/kg dintr-o singură afereză.

5. Prelucrarea produsului recoltat. Aceasta constă în:

- a. standardizarea volumului la 150 ml suspensie celulară per pungă prin adaos de DMSO și albumină 4% până la o concentrație finală de DMSO de 10%;
- b. prepararea eșantioanelor de control din produsul recoltat. Din aceste eșantioane se realizează următoarele determinări:
 - i. numărarea celulelor CD34+/kgc prin citometrie în flux (metodele ISHAGE și PROCOUNT). Valorile obținute pentru o afereză au variat între 0,04 și $19,24 \times 10^6/kgc$ primitor celule CD34+ la recoltare.
 - ii. teste de viabilitate directă cu albastru de tripan 0,4%. Valorile obținute au

fost 97 – 99% la recoltare.

iii. teste de capacitate funcțională a celulelor mononucleare recoltate prin cultivarea lor în agar moale pentru determinarea numărului de CFU-GM. Din eșantionul recoltat, celulele mononucleare se separă în gradient de densitate, într-un amestec Ficoll-Hypaque cu densitate de 1.077g/ml. După două spălări succesive, celulele se resuspendă în mediul de cultură și se numără într-o cameră de numărare (hemocitometru). Se calculează numărul de celule pentru o plăcuță de cultură și apoi se cultivă celulele în monostrat de metilceluloză, în prezența factorilor de creștere hematopoietici. Culturile sunt incubate timp de 12-14 zile la 37°C în atmosferă de CO₂ 5% și umiditate maximă. Pentru citirea coloniilor care apar în acest interval de timp se folosește un microscop inversat. Aglomerările de mai mult de 40 de celule se consideră colonii, iar acelea formate din mai puțin de 40 de celule se consideră grupuri (clusters).

iv. control bacteriologic (hemocultură) pentru germeni aerobi și anaerobi și fungi;

6. Congelarea programată în congelator cu azot lichid MiniDigitCool (până la temperatura de -196°C);

7. Stocarea în azot lichid în cuve ESPACE 200;

În Centrul de Hematologie și Transplant Medular din Institutul Clinic Fundeni au fost efectuate din 2001 până în decembrie 2005, 43 de transplanturi de celule stem hematopoietice (*Figura 1*).

Grefoanele administrate au dus la refacerea hematopoiezei într-un interval de 7 – 20 zile de la administrare. TCSH nu este o procedură chirurgicală. Este o perfuzie de produs sanguin labil (PSL) obținut prin procedură specială, prelucrat după protocoale specifice pentru obținerea unui grefon de calitate. Obținerea unui grefon de calitate implică o monitorizare susținută a donatorului (sănătos sau pacient) în perioada de dinaintea recoltării și în timpul recoltării și determinări convenționale (de bacteriologie) sau de înaltă performanță (citometrie în flux, culturi de celule stem hematopoietice) din concentratul de celule care urmează a fi transplantat.

Bibliografie:

1. Gratwohl A și col. Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. *Leukemia*. 2003; 17: 941-959.

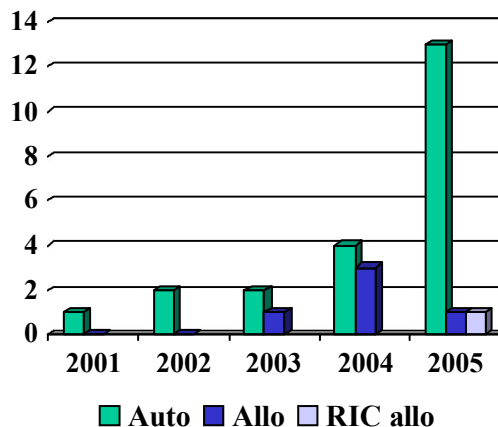
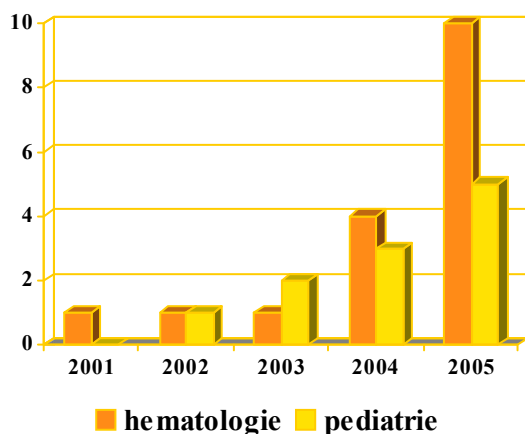


Figura 1. Transplanturile efectuate la Institutul Clinic Fundeni, Centrul de Hematologie și Transplant Medular “Ștefan Berceanu”, în perioada 2001-2005

2. Gratwohl A și col. Current trends in haematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*. 2002; 100: 2374-2386
3. Craddock C Biological Basis of Haematopoietic Stem Cell Transplantation in The EBMT Handbook Blood and Marrow Transplantation, revised editon 2000, p. 31-37
4. Richman C.M. și col. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47:1031-1039
5. Dreger P. și col. Source of Haemopoietic stem Cells in The EBMT Handbook Blood and Marrow Transplantation, revised editon 2000, p. 69- 90
6. Peters P. W și col. Collection, Cryopreservation and Use of Pheripheral Blood Progenitor Cells Primed with Colony-Stimulating Factor in Marrow Transplantation: Practical and Technical Aspects of Stem Cell Reconstitution, editors Sacher R.A and AuBuchon J.P, American Association of Blood Banks Bethesda, Maryland 1992, p.51 - 67
7. Arland M. și col. Ifosfamide, epirubicin and granulocyte colony-stimulating factor: a regimen for successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with multiple myeloma *Hematol Oncol* 2001;19:59-66