

С.В. Клименко
 Д.А. Базика
 І.С. Коренькова
 Є.Є. Караманешт
 Н.А. Голярник
 І.В. Абраменко
 Н.В. Беляєва
 В.В. Балан
 В.Г. Чуйський
 В.І. Хоменко
 В.Г. Бебешко

ДУ «Науковий центр
 радіаційної медицини»
 АМН України

Київський центр
 трансплантації кісткового
 мозку, Київ, Україна

Ключові слова:

трансплантація, гемопоетичні
 попередники, очистка,
 CD34⁺-клітини, CliniMACS.

ПОЗИТИВНА СЕЛЕКЦІЯ CD34⁺-КЛІТИН ТА АУТОЛОГІЧНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ОЧИЩЕНИХ ПЕРИФЕРИЧНИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПОПЕРЕДНИКІВ ПІСЛЯ ВИСОКОДОЗОВОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА ЗЛОЯКІСНІ ПУХЛИНИ

Резюме. Високодозна хіміотерапія з аутологічною трансплантацією стовбурових клітин є важливим методом лікування пацієнтів із онкологічними захворюваннями. Контамінація трансплантата стовбурових клітин клітинами пухлини може призводити до розвитку рецидиву, тому розробка технологій очистки від патологічних елементів може покращити результати лікування. У статті обговорюється перший досвід в Україні селекції з використанням системи магнетично-активованого сортування клітин (CliniMACS) та трансплантації очищеної CD34⁺-фракції периферичних гемопоетичних попередників після високодозової хіміотерапії.

ВСТУП

Високодозна хіміотерапія (ХТ) з наступним відновленням гемопоезу хворого шляхом реінфузії власних стовбурових клітин крові стала важливим етапом у покращанні результатів лікування онкологічних та онкогематологічних хворих [1]. Розвиток рецидиву є однією з проблем, що ускладнює широке впровадження аутологічної трансплантації гемопоетичних попередників. Введення аутологічного трансплантата може супроводжуватися реінфузією пухлинних клітин, що контамінують клітинну суміш. Результати досліджень з маркування генів довели реальність подібного сценарію [10]. Технології очистки, які селективно видаляють пухлинні клітини із трансплантата, можуть покращити виживання, вільне від рецидиву, для хворих, щодо яких планується виконання трансплантаційної процедури. Довгий час одним із перспективних напрямків оптимізації аутологічної трансплантації вважалися технології негативної деплеції [11]. Для мінімізації кількості залишкових клітин пухлини в трансплантаті, окрім хіміопрепаратів, використовували різноманітні антипухлинні антитіла. Обмеження у використанні такої процедури зумовлені гетерогенністю експресії антигенів-мішеней клітин пухлини у різних пацієнтів [7]. Останнім часом запропоновано інший метод, сутність якого полягає в позитивній селекції CD34⁺-клітин з аферезного продукту або аспірату кісткового мозку [3]. За позитивної селекції CD34⁺-клітин від неопластичних клітин з фенотипом CD34⁻, гетерогенність пухлинної популяції за іншими ознаками не має істотного значення і не є фактором, що обмежує ефективність очистки транс-

плантата. Таким чином, реінфузія фракції CD34⁺-клітин дозволяє знизити ризик повернення в організм хворого патологічних елементів і є достатньою для поновлення гемопоезу, зруйнованого попередньою високодозовою ХТ.

Дотепер клінічно апробовано 3 напрямки для здійснення CD34-позитивної селекції клітинної суміші в клінічній практиці. Один із них — метод CellPro дозволяє досягти середньої концентрації CD34⁺-клітин у 42% за надзвичайно широкого інтервалу коливань в окремих процедурах очистки (4,3–76,6%) [4]. Імовірно, саме внаслідок недостатньої чистоти кінцевої фракції селекціонованих клітин медіана логарифму деплеції залишкової пухлини була відносно низькою та складала 1,41 з коливаннями від 0,69 до 2,13. Інший метод базується на використанні системи Isolex 300 і дозволяє досягти значно більшої чистоти фракції CD34⁺-клітин. Leung і співавтори повідомили про медіану концентрації CD34⁺-клітин у 92% за очистки у такий спосіб клітинного продукту для аутологічної трансплантації стовбурових клітин периферичної крові для лікування хворих на нейробластоми з групи високого ризику [8]. Автори досягли й достатньо високої відтворюваності результатів обробки суміші з коливанням концентрації необхідних клітин в 49–99% та суттєвого зменшення контамінації залишковими елементами пухлини, що у середньому змінилася на 3 логарифми. Найновіша технологія позитивної селекції CD34⁺-клітин, що дозволяє досягти надзвичайно високого ступеня очистки трансплантата для клінічного застосування, полягає у здійсненні магнетично-активованого клітинного сортуван-

ня. При проведенні CD34-позитивної селекції для здійснення аутологічної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин (СГК) метод дозволяє досягти чистоти фракції CD34⁺-клітин до 95,7% зі збереженням загальної кількості CD34⁺-клітин у 69,5% від вихідного [9].

У цій роботі проаналізовано ефективність перших в Україні процедур селекції попередників із периферичної крові з використанням системи магнетично-активованого сортування клітин (CliniMACS) та результати трансплантації очищеної CD34-позитивної фракції периферичних гемопоетичних клітин після високодозової ХТ хворому на нейробластому з групи високого ризику.

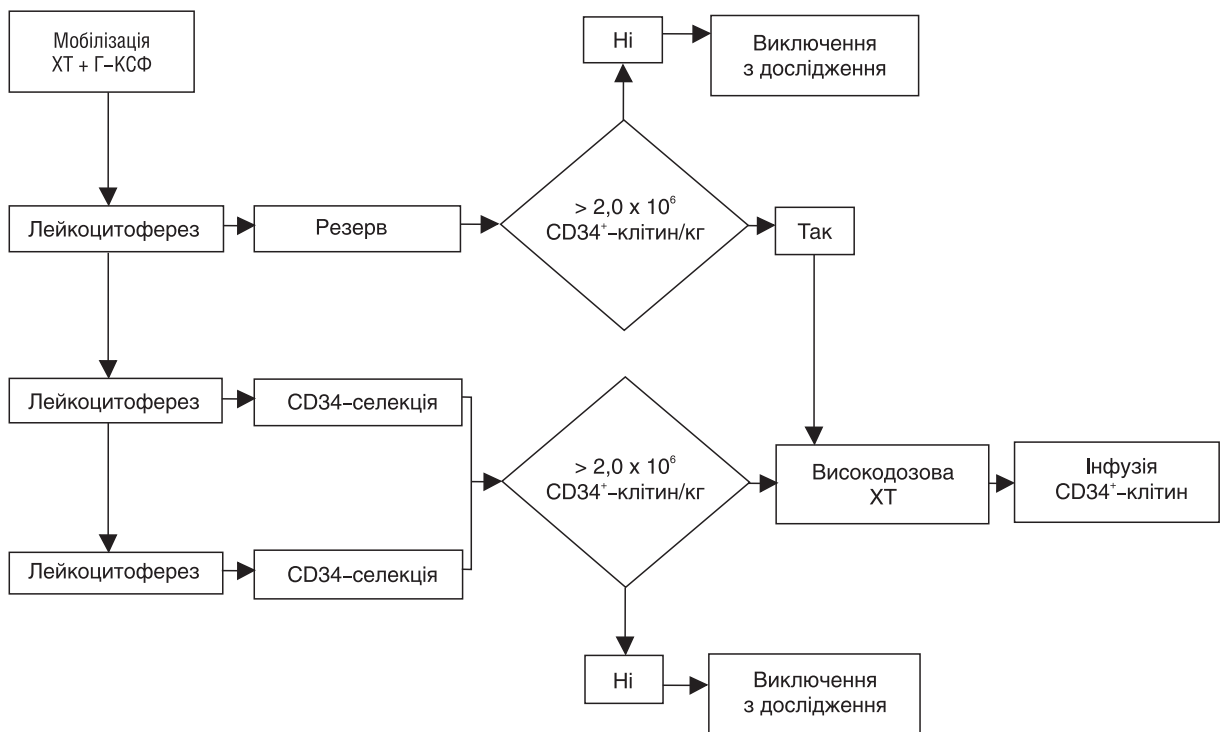
ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Трансплантація очищеної CD34-позитивної фракції периферичних гемопоетичних клітин була виконана на базі Київського центру трансплантації кісткового мозку (КЦТКМ) після високодозової ХТ хворій дитині віком 4 роки з діагнозом нейробластома позачеревної порожнини з ураженням кісткового мозку, стадія IV, T2N0M1. Процедура здійснена у відповідності до принципів Хельсинської декларації з прав людини 1975 р., після отримання інформованої згоди батьків. До високодозової ХТ хворий отримував лікування за протоколом «Neuroblastomastudie NB 97», результат якого був незадовільним (після третього курсу стандартної ХТ зберігалось ураження кісткового мозку, після четвертого — визначено залишкову пухлину в позачеревній порожнині). Хворому була виконана туморадреналектомія зліва, 2 додаткові курси ХТ. Схему подальшого лікування

з використанням мієлоаблативних доз цитостатиків та аутологічної трансплантації очищеної фракції CD34⁺-клітин наведено на рисунку.

Після останнього курсу стандартної ХТ проведено мобілізацію СГК за допомогою Г-КСФ («Нейпоген», «Хоффман-ля Рош», Швейцарія) у дозі 10 мкг/кг/день та 3 щоденні процедури лейкоцитозферезу під час фази гемопоетичного відновлення за допомогою сепаратора Кобе Спектра («Собе», США). Продукт 1-го лейкоцитозферезу залишали у резерві, 2-го та 3-го — піддавали передтрансплантаційному процесінгу та використовували в якості трансплантата.

Позитивна селекція CD34⁺-клітин здійснювалась у відділі гематології на трансплантології Наукового центру радіаційної медицини (НЦРМ) одразу після отримання продукту лейкоцитозферезу. Сутність методу полягає у розділенні суміші клітин на фракції у магнітному полі за допомогою використання імуномагнітної мітки, специфічної для клітин, які становлять інтерес для терапії. Для позитивної селекції клітин, що несуть на своїй поверхні антиген CD34, до клітинної суміші додається маркер — анти-CD34 моноклональні антитіла (МкАт), що поєднані з магнітною часткою. МкАт зв'язуються з антигеном, надаючи таким чином CD34⁺-клітині магнітного маркеру. Для цього лейкоцитозферезний продукт переводили в мішки об'ємом 600 мл («Baxter», США), доводили до стандартного об'єму 95 мл шляхом центрифугування та видалення надлишку плазми, додавали 7,5 мл анти-CD34 МкАт (клон АС 101) з магнітною міткою («Myltiniy Biotec», Німеччина) і інкубували при кімнатній температу-



Рисунк. Дизайн дослідження з оцінки ефективності використання селекції CD34⁺-клітин для передтрансплантаційного процесінгу аутотрансплантату для лікування хворого на нейробластому

рі протягом 30 хв за умов повільного перемішування. Продукт двічі відмивали в 0,5% розчині альбуміну людини та 1 ммоль EDTA в PBS для видалення надлишку антитіл. Далі використовували інструмент CliniMACS згідно з інструкцією виробника («Mytlinyi Biotec»). При здійсненні процедури селекції клітинна суміш проходить скрізь колонку з феромагнітним матриксом. Циклічна робота клітинного сортеру дозволяє періодично генерувати в колонці потужне магнітне поле. Мічені клітини затримуються в колонці, немічені проходять крізь неї без затримки, що сприяє сепарації клітинної суміші. Демагнітизація колонки вивільняє клітини, які становлять інтерес, окремою фракцією. Для цього одноразовий сет («Mytlinyi Biotec») з'єднували з гемотрансфузійним фільтром («Pall Incorporated»), заправляли в інструмент CliniMACS і промивали PBS для видалення повітря із системи. Мішок з продуктом, міченим антитілами, приєднували до системи. Селекція здійснювалася в автоматичному режимі під контролем мікропроцесора. Через 30 хв фракцію CD34⁺-клітин об'ємом 45 мл було вивільнено в окремий мішок.

Визначення кількості клітин в продукті лейкоцитозферезу, продукті селекції, оцінка їх життєздатності та кріоконсервування за вмісту DMSO 10% в рідкому азоті при температурі -196°C виконувалося згідно з загально визнаною методикою, відповідно до стандартної процедури КЦТКМ.

Експресію антигену CD34 визначали з використанням прямої імунофлуоресцентної техніки на проточному цитофлуориметрі FACScan («Becton Dickinson», США) з аргонним лазером зі збудженням хвилі довжиною 488 нм за протоколом Milan-Mullhouse [6] за допомогою програмного забезпечення LYSYS II. Цитофлуориметричні дослідження проводили у відділі імунології НЦРМ.

Міелоаблативна ХТ включала мельфалан 180 мг/м², карбоплатин 1500 мг/м² та етопозид 40 мг/кг в/в. Для реінфузії ізольовану фракцію CD34⁺-клітин швидко розморожували та без відмивання вводили хворому через центральний венозний катетер через 48 год після закінчення міелоаблативної ХТ.

Крім клінічного протоколу, для визначення можливостей обробки трансплантата з альтернативних джерел та опрацювання методики здійснено позитивну селекцію CD34⁺-клітин із зразка кордової крові, що зберігався протягом 20 міс у рідкому азоті. Після швидкого розморожування та дворазового відмивання клітинної суміші від DMSO у PBS/EDTA буфері («Mytlinyi Biotec») проведено процедуру сортування із застосуванням інструменту CliniMACS, визначення кількості клітин у суміші, оцінку їх життєздатності та вмісту CD34⁺-клітин за методикою описано вище.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проаналізовано результати 3 магнетичних селекцій клітинних сумішей. У двох випадках здійснював-

ся передтрансплантаційний процесінг SGK, отриманих із периферичної крові методом аферезу, для клінічного застосування. Отриманий продукт очищеної фракції CD34⁺-клітин був застосований для аутологічної трансплантації після високодозової ХТ хворому на нейробластоми за протоколом наведеним на рисунку. Після проведення стандартної ХТ та мобілізації SGK периферичної крові хворому віком 4 роки, вагою 19 кг, під час виходу з нейтропенії здійснено аферез із заготівлею $2,0 \times 10^6$ CD34⁺-клітин/кг маси тіла. Ця доза не підлягала подальшій обробці, була заморожена та слугувала резервом на випадок невдачі селекції. За недостатньої кількості клітин, заготовлених у процесі передтрансплантаційного процесінгу, або інших технічних проблем при маніпуляціях зі стовбуровими клітинами необроблений клітинний продукт надав би можливість здійснити трансплантацію і виконати загальний план лікування. Наявність клітин резерву уможливила подальше здійснення дослідження з очищення трансплантата. Протягом 2 послідовних днів здійснювалася позитивна селекція CD34⁺-клітин із щоденного аферезного продукту із застосуванням інструменту CliniMACS та анти-CD34 МкАт з магнітною міткою. Передтрансплантаційний процесінг виконували одразу після отримання аферезного продукту перед заморожуванням клітинної суміші. Формалізовані показники результатів аферезу та ефективності очищення клітинної суміші наведені в таблиці.

Таблиця
Характеристики аферезного продукту та показники ефективності очищення клітинної суміші перед аутологічною трансплантацією

Показник	Аферезний продукт	Продукт селекції
Селекція 1		
Об'єм продукту, мл	200	45
Вміст лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	44	1,5
Абсолютна кількість лейкоцитів, $\times 10^9$	8,8	0,045
Концентрація CD34 ⁺ -клітин, %	0,76	48,45
Загальна кількість CD34 ⁺ -клітин, $\times 10^7$	6,69	2,16
Кількість CD34 ⁺ -клітин/кг маси тіла реципієнта, $\times 10^6$	3,52	1,15
Селекція 2		
Об'єм продукту, мл	200	45
Вміст лейкоцитів, $\times 10^9/\text{л}$	43	1
Абсолютна кількість лейкоцитів, $\times 10^9$	8,6	0,0675
Концентрація CD34 ⁺ -клітин, %	0,66	24,57
Загальна кількість CD34 ⁺ -клітин, $\times 10^7$	5,68	1,66
Кількість CD34 ⁺ -клітин/кг маси тіла реципієнта, $\times 10^6$	2,99	0,87

Таким чином, загалом, після позитивної селекції було отримано $2,02 \times 10^6$ CD34⁺-клітин/кг маси тіла реципієнта, що було достатньо для здійснення аутологічної трансплантації з використанням виключно клітинного продукту процесінгу. Цей продукт було заморожено, хворий отримав міелоаблативну ХТ та реінфузію власних селекціонованих CD34⁺-клітин. Негативних ефектів процедури селекції не відзначено. Екстрагематологічна токсичність терапії за шкалою ВООЗ характеризувалася мукозитом III–IV ступеня та ентеропатією I ступеня. Приживлення трансплантата відбулося в звичайні строки із досягненням кількості нейтрофілів

у периферичній крові, що перевищувала $0,5 \times 10^9$ /л, на день +11, тромбоцитів $> 20 \times 10^9$ /л на день +16. Після відновлення кістково-мозкового кровотоку хворий знаходиться в стані повної ремісії протягом 2 років. Складно спекулювати щодо того, чи призвело в даному випадку використання в якості трансплантації очищеної фракції СГК з фенотипом CD34⁺ до покращання довгострокових результатів лікування. Але експеримент підтвердив надійність методу позитивної селекції, його відтворюваність. Слід очікувати, що модифікована процедура ауто-трансплантації надасть перевагу у безрецидивному виживанні, оскільки завдяки збільшенню частки CD34⁺-клітин у трансплантації більше ніж у 500 разів було суттєво зменшено вірогідність контамінації продукту клітинами пухлини.

У роботі повідомляється про перший в Україні досвід клінічного використання магнетичної клітинної селекції для здійснення трансплантації. У доступній літературі існують публікації про подібні дослідження з включенням суттєво більшої кількості хворих. Група Chou і співавтори досягли високої медіани чистоти продукту після обробки із застосуванням інструменту CliniMACS та анти-CD34 МкАт з магнітною міткою (81,5% CD34⁺-клітин) [2], про ще більший середній відсоток (97,6%) CD34⁺-клітин у кінцевій клітинній суміші для здійснення ауто-трансплантації при нейробластомі після аналогічної обробки повідомили Handgretinger та співавтори [5].

Можливим поясненням дещо нижчого показника чистоти кінцевого продукту в нашому дослідженні може бути особливість застосованих антитіл для оцінки кількості CD34⁺-клітин у клітинній суміші методом проточної цитофлуориметрії. У нашій роботі був застосований клон діагностичних анти-CD34 МкАт анти-НРСА II класу, що збігаються за епітопом з'єднання з магнетично-міченими анти-CD34-антитілами, які були використані для позитивної селекції. Таким чином, за умов слабкої експресії антигену на клітинах, які відповідали нашим інтересам, після обробки анти-CD34 МкАт з магнітною міткою суттєва кількість епітопів рецептора CD34 була зайнятою, що могло привести до неефективного забарвлення цих клітин діагностичними анти-CD34 МкАт. На вірогідність такого сценарію вказує той факт, що загальна кількість клітин у кінцевому продукті близько збігалася з кількістю CD34⁺-клітин у вихідній клітинній суміші — аферезному продукті (див. таблицю). Тому для вдосконалення процедури було вирішено в подальшому використовувати інший клон діагностичних анти-CD34 антитіл, зокрема анти-НРСА III, що реагують з III класом епітопів антигену CD34.

Для перевірки цієї гіпотези та визначення можливостей обробки трансплантації з альтернативних джерел було здійснено позитивну селекцію CD34⁺-клітин, що містяться в пуповинній крові. Особливістю цього експерименту було те, що обробляли зра-

зок, який було розморожено після тривалого зберігання у рідкому азоті. Об'єм зразка складав 160 мл, вміст лейкоцитів — $1,4 \times 10^9$ /л, життєздатність клітин — 95%. З урахуванням накопиченого досвіду, досягнуто значно кращої чистоти кінцевого продукту. Вміст CD34⁺-клітин у клітинній суміші після процесінгу з 0,02% вихідного рівня сягнув 69,12%.

Ми вважаємо досягнутий показник чистоти субоптимальним, принаймні, він знаходиться в межах коливань результатів окремих процедур CD34-позитивної селекції в дослідженнях інших авторів. Так, розкид чистоти очищеної суміші за показником вмісту CD34⁺-клітин у згаданій раніше групі Chou [2] становив 62,5–98,1%. Причинами, що могли дещо знизити ефективність очистки та зумовити 69% результат, можуть бути, по-перше, зміни експресії антигенів на поверхневих мембранах клітин, що тривало зберігалися при ультранизьких температурах і, по-друге, знижена внаслідок зберігання стійкість клітин до механічних навантажень під час селекції, зокрема додаткових центрифугувань та перемішувань суміші. Слід також зазначити, що в аферезному продукті присутні CD34⁺-клітини зі значною варіабельністю експресії антигену, що включають як стовбурові клітини, так і гемопоетичні попередники зі зниженою експресією CD34. Після селекції у продукті були представлені тільки клітини з високим рівнем експресії антигену, що відображає не тільки особливості протоколу Milan-Mullhouse, але, імовірно, й поріг чутливості власне процедури селекції магнетично-мічених клітин за допомогою інструменту CliniMACS. Про технічну бездоганність проведеної процедури процесінгу свідчить практична відсутність CD34⁺-клітин у негативній фракції — решті клітин, що залишилися після селекції клітин інтересу.

ВИСНОВКИ

1. Результати аналізу свідчать про ефективність методу магнетичної селекції СГК, відтворюваність та безпечність процедури трансплантації гемопоетичних клітин-попередників, очищених за допомогою інструменту CliniMACS та анти-CD34 МкАт з магнітною міткою.

2. Використання методу магнетичної селекції СГК слід вважати перспективним напрямком покращання результатів лікування онкологічних хворих.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бебешко ВГ, Мінченко ЖМ, Цветкова НМ та ін. Проблеми трансплантації кісткового мозку в Україні. Трансплантологія 2001; 2 (1): 16–22.
2. Chou T, Sano M, Ogura M, *et al.* Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34⁺ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution following high dose chemotherapy in patients with breast cancer: results of a feasibility study in Japan. Breast Cancer 2005; 12: 178–88.

3. **Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, et al.** Highly purified CD34 positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 2224–33.

4. **Handgretinger R, Greil J, Schurmann U, et al.** Positive selection and transplantation of peripheral CD34+ progenitor cells: feasibility and purging efficacy in pediatric patients with neuroblastoma. *Hematother* 1997; **6**: 235–42.

5. **Handgretinger R, Lang P, Ihm K, et al.** Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34+ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and long-term outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplantation* 2002; **29**: 731–6.

6. **Johnsen HE, Knudsen LM.** Nordic flow cytometry standarts for CD34+ cell enumeration in blood products: Report from the second Nordic workshop. *J Hematother* 1999; **5**: 237–45.

7. **Kremens B, Combaret V, Favrot MC, et al.** Evaluation of a modified immunomagnetic procedure for the purging of neuroblastoma cells from bone marrow. Evaluation eines modifizierten immunomagnetischen Verfahrens zur Entfernung von Neuroblastomzellen aus Knochenmark. *Monatsschr Kinderheilkd* 1990; **138**: 331–6.

8. **Leung W, Chen AR, Klann RC, et al.** Frequent detection of tumor cells in hematopoietic grafts in neuroblastoma and Ewing's sarcoma. *Bone Marrow Transplantation* 1998; **22**: 971–9.

9. **Miltenyi S.** CD34+ selection: the basic component for graft engineering. *Oncologist* 1997; **2**: 410–3.

10. **Rill DR, Santana VM, Roberts WM, et al.** Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; **84**: 380–3.

11. **Seeger RC, Vo DD, Ugelstad J, Reynolds CP.** Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies and magnetic immunobeads. *Progr Clin Biol Res* 1986; **211**: 285–93.

POSITIVE CD34⁺ CELLS SELECTION AND TRANSPLANTATION OF PURIFIED AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC PROGENITORS FOLLOWING HIGH DOSE CHEMOTHERAPY IN CANCER PATIENTS

S.V. Klymenko, D.A. Bazyka, I.S. Korenkova, E.E. Karamanesht, N.A. Golyarnik, I.V. Abramenko, N.V. Belyaeva, V.V. Balan, V.G. Chujskyi, V.I. Khomenko, V.G. Bebeszko

Summary. *High dose chemotherapy with autologous stem cells transplantation is an important therapeutic modality for the patients with oncological disorders. Since stem cells contamination by tumor cells might contribute to relapse, development of tumor cells purging technique could improve the clinical outcome. Here, we describe the first experience in Ukraine of selection using magnetic-activated cells sorting system (CliniMACS) and transplantation of purified autologous CD34⁺ fraction of hematopoietic cells following high dose chemotherapy.*

Key Words: transplantation, hematopoietic progenitors, selection, CD34⁺ cells, CliniMACS.

Адреса для листування:

Клименко С.В.

04050, Київ, вул. Мельникова, 53

ДУ «Науковий центр радіаційної медицини»

АМН України

E-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk