

A novel method of dimethyl sulfoxide introduction improves preservation of cryopreserved hematopoietic stem cells

Evgeniy V. Korotaev, Sergey V. Andrunkin, Andrey A. Stepanov, Sergey S. Ponomarev, Aleksey N. Kosarev, Svetlana S. Karakalcheva

Yugra Research Institute of Cellular Technologies with Stem Cell Bank, Khanty-Mansiysk, Russia

Contact: Dr. Evgeniy V. Korotaev
E-mail: Korotaev_J@mail.ru

Introduction

Ensuring high and predictable safety of stored hematopoietic stem cells (HSC) after their thawing and performing autologous transplantation is one of the main conditions for the further successful recovery of hemopoiesis after high-dose chemotherapy in patients with hemoblastosis. It is believed that the method of cryopreservation HSC has long been worked out and leads to the expected results, therefore usually used harvested HSC dose only. However, with the use of modern and reliable quality control, universally applied cryopreservation methods of HSC cannot always warrant sufficient integrity of these cells (Table 1).

It is well known that the safety of stored HSC is provided by a cryoprotectant, which prevents the cells from osmotic shock when they are frozen and thawed. A cryoprotectant with dimethyl sulfoxide (DMSO) is generally introduced via a syringe into the HSC suspension. At the same time, the final DMSO concentration in 5-10% is reached already in the cryopacket with the graft. However, a cryoprotectant with concentrated DMSO (more than 50%) upon contact with the cell, in view of its physicochemical properties, can lead to its partial destruction before freezing. Thus, increasing safety for HSC can be reduced by destructive effects, which may be due to the initially high concentration of DMSO in the cryoprotectant. To this end, we developed and tested a new method for introducing DMSO into the HSC transplant using a specially designed apparatus, i.e., an automated DMSO introduction system (patent pending). The principle of op-

eration of this system excludes prolonged contact of concentrated DMSO with HSC transplant.

Aim

The aim of our study was to compare the safety of HSCs using an automated and manual method of DMSO introduction.

Materials and methods

Peripheral blood stem cell samples (n=25) were obtained by apheresis from the patients with oncohematological diseases. For the control series (group I), DMSO introduction into a cryopacket with HSC graft was performed manually. In experimental series (group II), DMSO was introduced into the HSC transplant by a new automated method. A standard cryoprotectant (55% DMSO Dex 40) was used, the final DMSO concentration was 7.5%. Freezing (at the same time groups I and II) was performed in a software-assisted freezer with a validated 6-step program. Storage was carried out in liquid nitrogen. The cryopackets were thawed in a water bath at +40 for 1 min. Evaluation of viable HSCs numbers and their total colony-forming activity (CFU) was performed before and after the cryoprotection, as well as after thawing. To get more reliable results, the defrosted samples were taken from the cryopackets. The amounts of HSC was estimated by flow cytometric assay (CD34+/CD45dim/7AAD phenotype), according to the ISHAGE protocol. The colony-forming activity of HSC was evaluated by culturing them for 14 days (Methocult H4435) followed by counting total colonies (CFU).

Table 1. Role of quality control at various stages of graft handling

STAGE	Quality control (QC)		Aims of the QC
	Commonly	Required	
Harvesting HSK	Yes	Yes	Determining the dose of HSK
DMSO introduction and freezing	No	Yes	Predict probable losses
Defrosting and transplantation	No	Yes	Determine the transplanted dose
TOTAL	Not predictable	Yes predictable	Evaluate the duration of hematopoiesis recovery

Table 2. Quality control results after different procedures of DMSO introduction

DMSO introduction method	Recovery		
	HSC, %	7AAD, %	CFU (total), %
I Manual mode	88,2	93,1	97,8
II Automated method	88,3	94,2	99,2

Results

Similar viability indexes were revealed when testing the samples from the treatment series I and II. This fact may be due to the same incubation effect of DMSO on HSC, related to the duration of the analysis by flow cytometry. Thus, the exposure effect of DMSO on HSC is modelled. Hence, in absence of immediate freezing of HSC after DMSO introduction, the damaging effects are associated with the destructive physico-chemical effects of DMSO to cells, regardless of the manner of DMSO introduction.

It is generally accepted to freeze the transplant immediately after DMSO introduction. During this short time interval, only those cell lesions that are manifested immediately after the initial exposure to DMSO are conserved. Therefore, the dependence of the quality control of HSC safety after introducing the cryoprotectant by the method 2 could be more reliably estimated after defrosting.

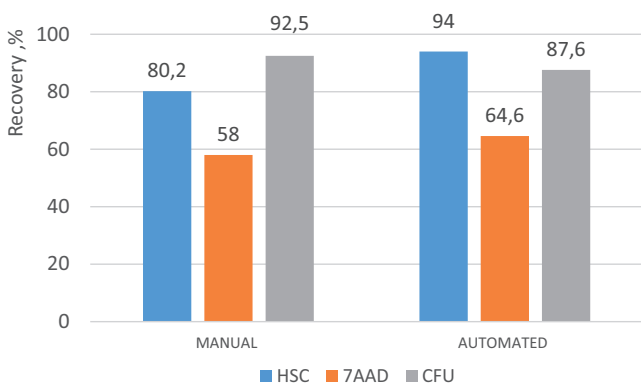


Figure 1. Recovery of total HSCs, viable cells and colony-forming units in cryopreserved HSCs treated with DMSO at different regimens

According to the results shown in the figure 1, the safety of HSC after defrosting is significantly higher by 14% ($p \leq 0.05$) when using the automated system in comparison with manual mode. Given all other equal conditions, the total losses of HSC after defrosting with the manual method averaged 20%, with an automated technique, 6%. At the same time, 6% include both HSC losses when DMSO is introduced, and HSC losses during the freezing procedure. Therefore, the losses caused by freezing can be assumed to be the same when using different methods of introducing DMSO. Therefore, in the manual process, the losses are associated with the step of DMSO introduction. We are thinking that the average preservation rate of 94% is due to the method of introducing DMSO using an automated system. The principle of operation of the automated system allows one to reduce the momentary damaging effect of the initial concentrated DMSO solution on HSC and to ensure its smoother dilution to the required final DMSO concentration of 7.5%. The results presented in the table and in the figure also show that DMSO at the stage of introduction at exposure may have a greater negative impact on HSC than the procedure for freezing the graft.

Conclusion

The safety of HSC when using an automated system is significantly higher by 14% compared to manual mode.

Keywords

Hematopoietic stem cells, cryopreservation, dimethyl sulfoxide, autologous transplantation.

Новый способ введения ДМСО повышает сохранность криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток

Евгений В. Коротаяев, Сергей В. Андрюнькин, Андрей А. Степанов, Сергей А. Пономарев, Алексей Н. Косарев, Светлана С. Каракальчева

АУ «Югорский НИИ клеточных технологий», Ханты-Мансийск, Российская Федерация

Введение

Обеспечение высокой и прогнозируемой сохранности гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) после их размораживания и проведения аутологичной трансплантации – одно из ключевых условий для дальнейшего успешного восстановления гемопоэза после высокодозной химиотерапии у пациентов с гемобластомами. Считается, что методика криоконсервирования ГСК давно отработана и приводит к ожидаемым результатам, поэтому обычно учитывается только заготовленная доза ГСК. Однако, при использовании современного и достоверного контроля качества, повсеместно применяемые методы криоконсервации ГСК не всегда могут гарантировать достаточную сохранность данных клеток (Табл. 1).

Общеизвестно, что сохранность ГСК при хранении обеспечивает криопротектор, защищающий клетки от осмотического шока при их замораживании. Криопротектор с ДМСО общепринято вводить при помощи шприца в трансплантат ГСК. При этом конечная концентрация ДМСО в 5-10% достигается уже в криопакете с трансплантатом. Однако криопротектор с концентрированным ДМСО (более 50%) при контакте с клеткой, ввиду своих физико-химических свойств, может привести к ее частичной деструкции еще до замораживания. Таким образом, повысить сохранность ГСК можно снизив деструктивное воздействие, которое может быть связано с исходной высокой концентрацией ДМСО в криопротекторе. Для этого нами разработан и апробирован новый способ введения ДМСО в трансплантат ГСК при

помощи специального сконструированного аппарата – автоматизированной системы введения ДМСО (на стадии патентования). Принцип действия данной системы исключает продолжительный контакт концентрированного ДМСО с трансплантатом ГСК.

Цель

Цель работы состояла в сравнении сохранности ГСК при использовании автоматизированного и ручного способа введения ДМСО.

Материалы и методы

Лейкоконцентрат ГСК периферической крови ($n=25$), полученный путем афереза у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Контрольная группа I – введение ДМСО в криopakет с трансплантатом ГСК выполняли ручным способом. Опытная группа II – введение ДМСО в трансплантат ГСК выполняли новым автоматизированным способом. Использовали стандартный криопротектор (55% DMSO Dex 40), конечная концентрация ДМСО – 7,5%. Замораживание (одновременно группы I и II) проводили на программном замораживателе по валидированной 6-ти ступенчатой программе. Хранение осуществляли в жидком азоте. Размораживание криopakетов проводили на водяной бане при +40 в течение 1 мин. Анализ количества жизнеспособных ГСК и их суммарной колониеобразующей активности (КОЕ) выполнялся до и после введения криопротектора, а также после размораживания. После размораживания для достоверности пробы отбирались из криopakетов. Количество ГСК оценивалось по фенотипу CD34+/CD45dim/7AAD проточной цитометрией по протоколу ISHAGE. Колониеобразующая активность ГСК оценивалась путем их культивирования в течение 14 суток (Methocult H4435) с последующим подсчетом суммарных колоний (КОЕ).

Результаты

Согласно представленным в таблице 2 результатам, сохранность ГСК в группах I и II после введения ДМСО

не отличается. Идентичные результаты, вероятно, обусловлены одинаковым инкубационным воздействием ДМСО на ГСК, связанным с продолжительностью проведения анализа методом проточной цитометрии. Тем самым моделируется экспозиционное воздействие ДМСО на ГСК. Из этого следует, что при отсутствии немедленного замораживания ГСК после введения ДМСО, повреждающие эффекты связаны с деструктивными физико-химическими свойствами ДМСО по отношению к клеткам, причем не зависимо от способа введения ДМСО.

Общепринято немедленно замораживать трансплантат сразу после введения ДМСО. В этот короткий временной промежуток будут законсервированы только те повреждения клеток, которые проявились сразу после первичного воздействия ДМСО. Поэтому зависимость контроля качества сохранности ГСК после введения криопротектора по методу 2 может быть оценена с большей достоверностью после размораживания. Контроль качества после размораживания отражен на рис. 1.

Согласно представленным на рисунке результатам, сохранность ГСК после размораживания достоверно выше на 14% ($p \leq 0.05$) при использовании автоматизированной системы в сравнении с ручным способом.

При прочих равных условиях исследования, суммарные потери ГСК после размораживания при ручном способе составили в среднем 20%, при автоматизированном – 6%. Они включают потери ГСК при введении ДМСО, а также утрату ГСК в процессе замораживания. Поэтому потери, вызванные замораживанием, можно принять как одинаковые при использовании разных способов введения ДМСО. Следовательно, при ручном способе потери связаны с этапом введения ДМСО. Мы полагаем, что средняя сохранность в 94% обусловлена способом введения ДМСО с использованием автоматизированной системы. Принцип работы автоматизированной системы позволяет снизить одномоментное повреждающее влияние исходного концентрированного раствора ДМСО на ГСК и обеспечить его более плавное

Таблица 1. Роль контроля качества на различных этапах работы с трансплантатом

ЭТАП	Контроль качества		Задачи контроля
	Общепринято	Необходимый	
Заготовка ГСК	Да	Да	Определить дозу ГСК
Введение ДМСО и замораживание	Нет	Да	Спрогнозировать вероятные потери
Размораживание и трансплантация	Нет	Да	Определить трансплантированную дозу ГСК
ИТОГ	Не предсказуемо	Да предсказуемо	Оценить срок восстановления кроветворения

Таблица 2. Контроль качества гемопоэтических стволовых клеток непосредственно после введения ДМСО

Способ введения ДМСО	Сохранность		
	ГСК, %	7AAD, %	КОЕ (сумм), %
I Ручной способ	88,2	93,1	97,8
II Автоматизированный способ	88,3	94,2	99,2

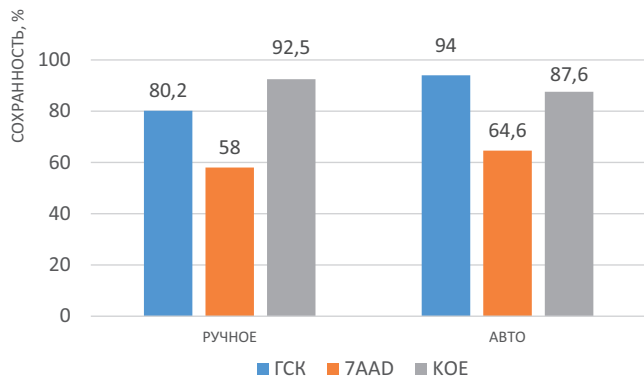


Рисунок 1. Выход гемопоэтических клеток после ручного или автоматизированного введения ДМСО и криоконсервирования по различным критериям

разбавление до необходимой конечной концентрации ДМСО в 7,5%. Результаты, представленные в таблице и на рисунке, также показывают, что ДМСО на этапе его введения при экспозиции может оказывать большее негативное воздействие на ГСК, чем процедура замораживания трансплантата.

Заключение

Сохранность ГСК при использовании автоматизированной системы введения ДМСО достоверно (на 14%) выше в сравнении с ручным способом.

Ключевые слова

Гемопоэтические стволовые клетки, криоконсервация, диметилсульфоксид, аутологичная трансплантация.

Autologous hematopoietic stem cell transplantation in children and teenagers with Hodgkin's Lymphoma

Andrey V. Kozlov, Ilya V. Kazantsev, Elena V. Morozova, Tatiana V. Iuchta, Polina S. Tolkunova, Asmik G. Gevorgian, Mihail M. Kanunnikov, Kirill V. Lepik, Yuri R. Zalyalov, Elena V. Babenko, Maria A. Estrina, Natalia B. Mikhailova, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Institute for Children Oncology, Hematology and Transplantation at the First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Andrey V. Kozlov

E-mail: kozlovandrew1983@yandex.ru

Introduction

Standard therapy cures 70-90% of patients with Hodgkin's lymphoma (HL). Autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) is an effective treatment option in chemosensitive relapsed or refractory disease. Despite long-term experience the data on the role of auto-HSCT in children are limited.

Materials and methods

Between 1993-2017, sixty-six HL patients at the median age of 16 (4-18) received auto-HSCT. Nodular sclerosis was diagnosed in 59 patients (89%), mixed cellularity type, in 6 (9%), lymphocyte depletion form, in 1 (2%). Clinical stage IV was assessed in 29 patients (44%), stage III, in 18 (27%), stage II, in 17 (26%), stage I, in 2 cases (3%); B symptoms were documented in 43 cases (65%). Relapsing course of the disease was revealed in 45 children and teenagers (68%), and refractory disease was confirmed in 21 cases (32%). First-line therapy was carried out according to GPOH-HD protocol in 37 patients (56%); BEACOPP was applied in 21 cases (32%); ABVD, in 8 cases (12%). Second-line therapy included IEP/ABVD in GPOH-HD group, and DHAP or ICE in BEACOPP or ABVD groups. Early HL relapses (<12 months) were diagnosed in 26 children and teenagers (58%), and late relapse was stated in 19 patients (42%). Median number of therapy lines prior to auto-HSCT was 2 (1 to 6). Complete remission at the moment of auto-HSCT was achieved in 25

patients (38%), partial remission, in 25 (38%), stabilization, in 6 (9%), and progression of the disease was observed in 10 (15%). The conditioning regimens included BEAM (n=24, 36%), BeEAM (n=22, 33%), CBV (n=13, 20%), others (n=7, 11%).

Results

Long-term overall survival (OS) was 48%, and progression free survival was 41%. The OS values in cases of chemosensitive disease were 64%, and in chemoresistant disease, 33%, (p=0.005). BeEAM and BEAM conditioning regimens have shown comparable effectiveness (OS, 62% and 51%, respectively, p=0.6). Transplant-related mortality was 4.5%. Lethal complications were associated with infections in 2 patients and high-dose chemotherapy toxicity in 1 patient (lung fibrosis).

Conclusion

Auto-HSCT cures approximately half of children and teenagers with relapsed or refractory HL. Chemosensitivity of the disease is an essential factor for the success of auto-HSCT. BEAM and BeEAM conditioning regimens are equally effective in children.

Keywords

Hodgkin's lymphoma, pediatric, hematopoietic stem cell transplantation, autologous, survival rates.