

Особенности восстановления показателей периферической крови у реципиентов трансфузионной среды криоконсервированных клеток пуповинной крови при гипопластических состояниях кроветворения в гематологической клинике

А.П. Гашук, Т.А. Калиниченко, Г.Т. Глухенькая

Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, г. Киев

Peculiarities of Recovery of Peripheric Blood Indices in Recipients of Transfusion Medium of Umbilical Blood Cryopreserved Cells at Hemopoiesis Hypoplastic State in Haematological Clinic

A.P. GASCHUK, T.A. KALINICHENKO, G.T. GLUKHENKA

Institute of Haematology and Transfusiology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

Отмечены особенности восстановления показателей периферической крови при применении трансфузионной среды с криоконсервированными ядерными клетками пуповинной крови у больных с гемодепрессивными состояниями в гематологической клинике.

Ключевые слова: пуповинная кровь, ядерные клетки, криоконсервирование, гемодепрессии.

Відзначено особливості відновлення показників периферичної крові при застосуванні трансфузійного середовища з криоконсервованими ядерними клітинами пуповинної крові у хворих з гемодепресивними станами в гематологічній клініці.

Ключові слова: пуповинна кров, ядерні клітини, криоконсервування, гемодепресії.

Peculiarities of recovery in peripheric blood indices when using trasfusion medium with cryopreserved nucleated cells of umbilical blood in patients with hemodepressive states in hematological clinic have been demonstrated.

Key-words: umbilical blood, nucleated cells, cryopreservation, hemodepression.

В сотнях банков Европы, Америки и других континентов хранятся десятки тысяч единиц криоконсервированной пуповинной крови (ПК). Цель создания таких запасов – применение трансплантатов гемопоэтической ткани, альтернативных костному мозгу [1, 5].

Вопрос о применении клеток ПК тесно связан с разработкой методов её забора и длительного хранения, а также методик клинического применения, так как в этой области отсутствуют международные стандарты.

Результаты применения ядродержащих клеток (ЯСК) у онкологических больных с солидными опухолями различной локализации (рак молочной железы, рак яичника, рак желудка), а также с лимфогранулематозом и злокачественной лимфомой, находившихся на лечении в отделениях Института онкологии АМНУ, показали эффективность включения трансфузий компонентов ПК в программы лечения симптомокомплекса стойких цитостатических миелодепрессий [2, 3]. При этом повышалось качество лечения основного заболевания.

Среди других патологий, характеризующихся выраженностью миелодепрессивного синдрома, особое место занимают расстройства крове-

In hundreds of banks of Europe, America and other continents there are dozens thousands of units of cryopreserved umbilical blood (UB) under storage. The aim of these stocks is application of hemopoietic tissue transplants as an alternative to bone marrow [1, 5].

The question about use of UB cells is tightly related to the development of its procurement and long-term storage methods as well as the techniques of clinical application, as in this field there are no international standards.

Results of usage of nucleated cells (NCs) in oncological patients with solid tumours of various localization (breast cancer, ovarian carcinoma, stomach cancer) as well as those with lymphogranulomatosis and malignant lymphoma, been treated at different departments of the Institute of Oncology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine have shown the efficiency of transfusions of UB components into treatment protocols of symptoms of stable cytostatic myelodepressions [2, 3]. Herewith a treatment quality of main diseases improved.

Among other pathologies characterized with a manifested myelodepressive syndrome a special place is taken by hemopoiesis disorders, that are associated with both targeted specific action of cytostatic therapy protocols on hemopoietic stem cells of a recipient and

Адрес для корреспонденции: Калиниченко Т.А., Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, ул. М. Берлинского, 12, г. Киев, Украина 04060; тел.:+38 (044) 440-31-55, факс: +38 (044) 440-27-22, e-mail: igt@ln.ua

Address for correspondence: Kalinichenko T.A., Institute of Hematology and Transfusiology of Academy of Medical Sciences of Ukraine, 12, M. Berlinsky str., Kiev, Ukraine 04060; tel.:+380 44 440 3155, fax: +380 44 440 2722, e-mail: igt@ln.ua

творения, что связано как с целенаправленным специфическим действием схем цитостатической терапии на стволовые гемопоэтические клетки реципиента, так и с патогенезом основного заболевания. Таким образом, трансфузионная среда биологически полноценных ЯСК ПК может применяться в комплексном лечении таких больных.

Материалы и методы

Забор крови производили из пупочной вены методом “замкнутой” системы сразу после отделения новорожденного от матери. Раствор “Глюгидир” использовали как стабилизатор в соотношении ПК:раствор=4:1. Образцы ПК имели следующие характеристики: средний объём – 49,3 мл (от 35 до 60 мл), общее количество ЯСК от $5,00 \times 10^8$ до $11,87 \times 10^8$ на образец, из них мононуклеаров – от 15 до 52 % клеток.

Контроль образцов на наличие возбудителей трансмиссивных инфекций проводили путём скрининга сыворотки крови матери методом иммуноферментного анализа. Образцы ПК тестировали на принадлежность по системе АВ0 и Rh-фактору, а также исследовали на стерильность.

Как криопротектор использовали медицинский низкомолекулярный (молекулярная масса – 8000 ± 2000) поливинилпирролидон (ПВП) в конечной концентрации 8%. Образцы замораживали в камере программного замораживателя УОП-6 по общепринятой программе скоростей замораживания для ЯСК крови и костного мозга под защитой ПВП (адаптированные к холоду при температуре 4°C в течение 20-ти минут образцы подвергали медленному замораживанию со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ от 4°C до -6°C , далее от -6 до -80°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$), хранили при температуре жидкого азота. Отогревали в аппарате для размораживания биопродуктов при температуре $40,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Качество образцов контролировали анализом материала в ампулах-спутниках. После размораживания и подготовки к трансфузии [4] криоконсервированные клетки ПК применяли у гематологических больных (отделение заболеваний системы крови Института гематологии и трансфузиологии АМН Украины). Трансфузии клеток ПК ($n=22$) осуществляли больным острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) (стадия – II-III рецидив) при гипоплазиях кроветворения в результате проведения курсов индукции ремиссии, а также при панцитопениях у больных с апластическими анемиями (АА) (стадия – II-III обострение). Доза ЯСК составляла от $0,71 \times 10^7$ до $2,28 \times 10^7$ (в среднем – $(1,50 \pm 0,11) \times 10^7$) на 1 кг массы реципиента.

with pathogenesis of main disease. Thus transfusion medium of biologically integral UB NCs may be used in a combined treatment of such patients.

Materials and methods

Blood was procured from umbilical vein by “closed” system method just after separating newborn and mother. “Glugicyr” solution was added as stabilizer to UB in 1:4 ratio. UB samples had following characteristics: an average volume was 49.3 ml (from 35 to 60 ml), total number of NCs from 5.00×10^8 to 11.87×10^8 per sample, among them nucleated cells from 15 up to 52% of cells.

Control of samples on the presence of transmissible infection germs was performed by screening of mother’s blood serum with the method of immune enzyme analysis. UB samples were tested as for belonging to АВ0 system and Rh-factor as well as examined on sterility.

Medical low molecular ($8,000 \pm 2,000$) polyvinyl pyrrolidone (PVP) under 8% final concentration was used as cryoprotectant. The samples were frozen in a chamber of UOP-6 programmable freezer according to traditional program of freezing rates for blood NCs and bone marrow under PVP protection (cold exposure at 4°C during 20 min, followed by freezing with slow rate of 1°C per min from 4 to -6°C , and rate of 10°C from -6°C to 80°C), they were stored at liquid nitrogen temperature. Thawing was performed in the device for thawing of biological products at temperature of $40.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Sample quality was controlled by analysis of material in satellite vials. After thawing and preparing to transfusion [4] UB cryopreserved cells were used for haematological patients (department of blood system diseases, the Institute of Haematology and Transfusiology of Academy of Medical Sciences of Ukraine). UB cell transfusion ($n = 22$) was performed for patients with acute myeloid leukaemia (AML) (stage – 2-3 backset) at hemopoiesis hypoplasia as a result of remission induction courses as well as at pancytopenia in patients with aplastic anemia (AA) (stage – 2-3 acute). NCs dose was from 0.71×10^7 up to 2.28×10^7 ($(1.50 \pm 0.11) \times 10^7$ in average) per kg of a recipient’s body mass.

Dynamic indices of peripheral blood of patients was traced to the 7th, 14th and 21st post-transfusion days. Mean values of some indices and statistical significance of their differences were found using Student t-criterion.

Results and discussion

Practically in all patients there were found signs of subjective and objective improvement of the state even at second-third post-transfusion day that generally positively affected their life quality. Herewith no post-

Динамику показателей периферической крови больных отслеживали на 7, 14, 21-е сутки после трансфузии. Средние величины отдельных показателей и достоверность их различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Практически у всех больных отмечались признаки субъективного и объективного улучшения состояния уже на вторые-третьи сутки после трансфузии, что в целом положительно повлияло на качество их жизни. При этом посттрансфузионных реакций замечено не было даже у больных, имевших в анамнезе реакции на многократные трансфузии компонентов периферической крови.

В группе больных с ОМЛ ($n=15$) в среднем на 7-е сутки после трансфузии ЯСК ПК имело место достоверное увеличение количества лейкоцитов в 1,6 раза (от $(1,27\pm 0,1)\times 10^9$ до $(2,08\pm 0,21)\times 10^9/\text{л}$, $p<0,01$), тромбоцитов – в 2,8 раза (от $(31,88\pm 3,78)\times 10^9$ до $(87,83\pm 10,12)\times 10^9/\text{л}$, $p<0,01$). При этом доля нейтрофильных гранулоцитов возросла в 1,7 раза (от $15,17\pm 2,54$ до $26,36\pm 3,47\%$, $p<0,05$), а лимфоцитов снизилась в 1,3 раза (от $70,83\pm 5,65$ до $51,54\pm 7,18\%$, $p<0,05$). К 21-м суткам уровень лейкоцитов достоверно увеличивался в среднем в 3,9 раза, тромбоцитов – в 3 раза (до $(4,96\pm 0,36)\times 10^9$ и $(92,00\pm 11,70)\times 10^9/\text{л}$ соответственно). Доля нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов при этом в среднем сохраняется на уровне 7-х суток.

У половины больных к 7-14-м суткам достоверно возросли количество эритроцитов и уровень гемоглобина (в среднем в 1,4-1,7 раза). Наблюдалось увеличение количества лейкоцитов у этих больных от 1,5 до 10 раз, а тромбоцитов – от 2 до 10 раз (в одном случае – до 30 раз). При этом на фоне возобновления курса полихимиотерапии уровень тромбоцитов в этой группе больных не опускался ниже $51\times 10^9/\text{л}$, что исключало потребность в тромбоконцентратной гемокомпонентной терапии. В 20% случаев была достигнута клинико-гематологическая ремиссия.

Необходимо отметить, что blastosis периферической крови имел место у половины кандидатов на трансфузию ПК, что существенно повлияло на её результат. У этой категории пациентов эффективность применения ПК в плане изменения показателей периферической крови варьировала от слабовыраженного улучшения до полного его отсутствия. При этом все реципиенты ПК отмечали улучшение общего состояния, субъективно проявлявшееся в поднятии жизненного тонуса, улучшении аппетита.

transfusion reactions were observed even in patients having in anamnesis the responses to multiple transfusions of peripheric blood components.

In the group of patients with AML ($n =15$) in average to the 7th day after transfusion of UB NCs a statistically significant rise in the number of leukocytes in 1.6 times took place (from $(1.27\pm 0.1)\times 10^9$ up to $(2.08\pm 0.21)\times 10^9/\text{l}$, $p< 0.01$), in 2.8 times for platelets (from $(31.88\pm 3.78)\times 10^9$ up to $(87.83\pm 10.12)\times 10^9/\text{l}$, $p<0.01$). Herewith the share of neutrophil granulocytes increased in 1.7 times (from 15.17 ± 2.54 up to $26.36\pm 3.47\%$, $p<0.05$) and for lymphocytes it decreased in 1.3 times (from 70.83 ± 5.65 up to $51.54\pm 7.18\%$, $p< 0.05$). To the 21st day the level of leukocytes statistically and significantly increased in average by 3.9 times, thrice for platelets (up to $(4.96\pm 0.36)\times 10^9$ up to $(92.00\pm 11.70)\times 10^9/\text{l}$, correspondingly). Share of neutrophil granulocytes and lymphocytes in this case in average was kept at the level of the 7th day.

In a half of patients to the 7-14th day there was found an increase in the number and level of haemoglobin (in average in 1.4-1.7 times). The rise in the number of leukocytes in these patients was observed from 1.5 to 10 times and from 2 to 10 times for platelets. Herewith on this background of repeated polychemotherapy course the level of platelets in this group of patients did not decrease lower than $51\times 10^9/\text{l}$ that excluded the demand in platelet concentrate hemocomponent therapy. In 20% of cases clinical haematological remission was achieved.

It should be noted that blastosis of peripheral blood had place in a half of candidates for UB transfusion that greatly affected its result. In this category of patients the efficiency of UB application as for change in parameters of peripheral blood varied from slight improvement to its complete absence. It should be emphasized that all UB recipients noticed an improvement of general state, which had a subjective manifestation in vital activity rise, appetite improvement.

In group of patients with AA ($n=7$) an initial level of leukopenia was moderate. Indications to UB transfusion was pronounced suppression degree of megakaryocytic and erythroid lineages.

In these patients there was no found any statistically significant change in parameters of peripheral blood in post-transfusion period. At the same time to the 21st observation day there was traced a clear tendency to an increase in the number of leukocytes (in 1.2 times) and platelets (in 1.5-2 times) if compared with initial data. Herewith statistically significant changes took place in blood formula of patients. These alterations were manifested in a relative rise on neutrophil granulocytes (from 21.42 ± 5.16 up to $32.33\pm 7.38\%$, $p<0.05$), monocytes (from 5.14 ± 1.04 up to $8.33\pm 0.99\%$,

В группе больных с АА (n=7) исходный уровень лейкопении был умеренным. Показаниями к трансфузии ПК была выраженная степень угнетения мегакариоцитарного и эритроцитарного ростков. У этих больных не отмечалось достоверного изменения показателей периферической крови в посттрансфузионном периоде. Вместе с тем к 21-м суткам наблюдения прослеживалась явная тенденция к повышению количества лейкоцитов (в 1,2 раза) и тромбоцитов (в 1,5-2 раза) по сравнению с исходными данными. При этом имели место достоверные изменения в формуле крови больных, выразившиеся в относительном увеличении нейтрофильных гранулоцитов (от $21,42 \pm 5,16\%$ до $32,33 \pm 7,38\%$, $p < 0,05$), моноцитов (от $5,14 \pm 1,04\%$ до $8,33 \pm 0,99\%$, $p < 0,05$) и соответственно – снижении доли лимфоцитов (от $77,51 \pm 10,87\%$ до $55,67 \pm 8,64\%$, $p < 0,05$). При этом у всех больных АА наблюдалось улучшение качества жизни.

Показанием к применению трансфузий криоконсервированных ЯСК ПК было наличие у больных признаков гемодепрессии в виде одно-, двух- или трёхростковой цитопении. При этом гемодепрессия была главным образом следствием проведения цитостатической терапии и/или симптомом основного заболевания. Ожидаемый эффект снижения риска возникновения осложнений, обычно являющихся результатом цитостатической болезни, был в основном достигнут за счет смягчения признаков гемодепрессии. Терапевтическое воздействие трансфузионной среды криоконсервированных ЯСК ПК превосходило влияние компонентов донорской крови в аналогичных клинических ситуациях. Улучшение общего состояния больных в сочетании с уменьшением степени депрессии кроветворения у больных с ОМЛ позволяло начать очередной курс полихимиотерапии. Стойкость полученного эффекта во многих случаях способствовала отказу от заместительной терапии компонентами периферической крови (тромбоконцентрат) в ходе дальнейшего лечения.

Механизм действия криоконсервированных ЯСК ПК у тяжелых больных в качестве терапии “отчаяния” предположительно рассматривается как результат гуморальной стимуляции кроветворения реципиента цитокинами, присутствующими в неонатальной крови, а также временного приживления донорских клеток.

Отсутствие у сенсibilизированных реципиентов каких-либо посттрансфузионных реакций является, с одной стороны, свидетельством качества трансфузионной среды, содержащей криоконсервированные клетки пуповинной крови,

$p < 0,05$) and correspondingly, in a reduction of the share of lymphocytes (from 77.51 ± 10.87 up to $55.67 \pm 8.64\%$, $p < 0,05$). In this case in all patients with AA there was found an improvement of life quality.

Indication for transfusion of cryopreserved UB NCs was the presence of hemodepression signs as one-, two or three-lineage cytopenia in patients. Herewith hemodepression was generally the consequence of cytostatic therapy course and/or symptom of main disease. Anticipated effect of reducing the risk of complications appearance usually being the result of cytostatic diseases, was mainly achieved due to smoothing of hemodepression signs. Therapeutic effect of transfusion medium of cryopreserved UB NCs exceeded the one of donor's blood components in the similar clinical situations. Improvement of general state of patients together with a decrease in hemopoiesis depression degree in patients with AML enabled to start the next course of polychemiotherapy. Stability of obtained effect in many cases contributed to a waiver from substitutive therapy by the components of peripheral blood (platelet concentrate) in the course of further treatment.

The action mechanism of cryopreserved UB NCs is considered as a result of a recipient's humoral hemopoiesis stimulation by cytokines which are present in neonatal blood as well as temporary engraftment of donor's cells.

Absence of any post-transfusion responses in sensibilized recipients from one hand is the confirmation of the quality of transfusion medium, containing cryopreserved cells of umbilical blood, and from another hand the one of relative tolerance of its immune competent cells.

Conclusions

Transfusion medium of biologically integral UB NCs due to efficient storage protocols may be used in a combined treatment of patients with severe hemopoiesis pathologies, when the manifestation of myelodepressive syndrome is related to both targeted specific action of cytostatic protocols on hemopoietic stem cells of a recipient (AML) and pathogenesis of main disease (AA). Herewith there is observed an improvement of patient's life quality, smoothing of myelodepressive syndrome, the tendency to a reduction of the demand in substitutive therapy by donor's blood components in the course of further treatment of main disease is traced. Transfusion of cryopreserved UB results on a stable correction of cytopenia in the absence of post-transfusion responses that testifies to biological full value of cryopreserved and the material prepared to clinical use.

с другой – подтверждением относительной толерантности её иммунокомпетентных клеток.

Выводы

Трансфузионная среда биологически полноценных ЯСК ПК, благодаря эффективным технологиям хранения, может применяться в комплексном лечении тяжелобольных с патологией кроветворения, когда выраженность миелодепрессивного синдрома связана как с целенаправленным специфическим действием схем цитостатической терапии на стволовые гемопоэтические клетки реципиента (ОМЛ), так и с патогенезом основного заболевания (АА). При этом наблюдаются улучшение качества жизни больного, смягчение миелодепрессивного синдрома, прослеживается тенденция к снижению потребности в заместительной терапии компонентами донорской крови в ходе дальнейшего лечения основного заболевания. Трансфузия криоконсервированной ПК приводит к стойкой коррекции цитопении при отсутствии посттрансфузионных реакций, что свидетельствует о биологической полноценности криоконсервированного и подготовленного к клиническому применению материала.

Литература

1. *Калиниченко Т.А., Гольцев А.Н.* Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть III. Криоконсервирование // Пробл. криобиологии.– 1999.– №1.– С. 45-57.
2. *Перехрестенко П.М., Сівкович С.О., Глухенька Г.Т. та інші.* Застосування криоконсервованої кордової крові при лікуванні хворих на злоякісну лімфому // Лікарська справа.– 2002.– №2.– С. 76-80.
3. *Шалимов С.А., Кейсевич Л.В., Литвиненко А.А. и др.* Лечение неоперабельных опухолей органов брюшной полости.– Киев, 1998.– 253 с.
4. *Пат. України № 30014А МПК 6 А01N 1/02, А61К 35/14.* Спосіб криоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові / П.М. Перехрестенко, Г.Т. Глухенька, М.К. Алгазінова та інші. Опубл. 15.11.2000 р, Бюл. № 6-11.
5. *Broxmeyer H.E., Srour E.F.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // PNAS.– 2002.– Vol. 100, N2.– P. 645-650.

Поступила 01.09.2005

References

1. *Kalinichenko T.A., Goltsev A.N.* Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part III. Cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1999.– N1.– P. 45-56.
2. *Perekherstenko P.M., Sivkovich S.O., Glukhenka G.T. et al.* Use of cryopreserved cord blood when treating patients with malignant lymphoma // Likarska sprava.– 2003.– N2.– P. 76-80.
3. *Shalimov S.A., Kejsevich L.V., Litvinenko A.A. et al.* Treatment of inoperable tumors of peritoneal cavity organs.– Kiev, 1998.– 253 p.
4. *Patent of Ukraine, N30014A IPC 6 A01N1/02, A61K35/14.* Way of cryopreservation and preparing for transfusion of cord blood hemopoietic cells. / P.M. Perekhrestenko, G.T. Glukhenka, M.K. Algazinova et al.– Publ. 15.11.2000, Bull. N6-11.
5. *Broxmeyer H.E., Srour E.F.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years // PNAS.– 2002.– Vol. 100, N2.– P. 645-650.

Accepted in 01.09.2005