

гистрирован у 2 из 47 МОБ негативных (МОБ-) пациентов (4,3%). При статистическом анализе выявлены различия между МОБ+ и МОБ-пациентами: МОБ позитивные больные имели худшую ОВ (42% против 89%,  $p=0,0120$ , рис. 1А) и БРВ (32% против 94%,  $p < 0,0001$ , рис. 1В). Вероятность развития рецидива была значимо выше среди пациентов с МОБ+ статусом до ТГСК (68% против 6%,  $p < 0,0001$ , рис. 1С).

## Выводы

МОБ, определяемая с помощью МПЦ, зарекомендовала себя, как сильный прогностический фактор риска развития рецидива и оказывает влияние на ОВ и БРВ у

пациентов с ОМЛ после алло-ТГСК. В нашем исследовании МОБ+ статус был ассоциирован с высоким риском развития рецидива, несмотря на наличие морфологической ремиссии перед алло-ТГСК. Таким образом, определение МОБ перед алло-ТГСК может помочь выявить группу пациентов, которым необходимо проведение поддерживающей терапии после алло-ТГСК.

## Ключевые слова

Минимальная остаточная болезнь, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, острый миелоидный лейкоз.

# Results of a quality control implementation at the stage of dimethyl sulfoxide introduction into autologous transplant of hematopoietic stem cells

Evgeniy V. Korotaev<sup>1</sup>, Andrey A. Stepanov<sup>1</sup>, Sergey A. Ponomarev<sup>1</sup>, Aleksey N. Kosarev<sup>1</sup>, Svetlana S. Karakalcheva<sup>1</sup>, Elena E. Zinina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Yugra Research Institute of Cellular Technologies/Stem Cell Bank, Khanty-Mansiysk, Russia

<sup>2</sup> Surgut Regional Clinical Hospital, Surgut, Russia

Contacts: Dr. Evgeniy V. Korotaev

E-mail: Korotaev\_j@mail.ru

## Introduction

When conducting autologous hematopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT), the decrease in HSC safety at the stage of introducing cryoprotectant is usually not taken into account. Meanwhile, introduction of concentrated dimethyl sulfoxide (DMSO) negatively affects cell membranes, which leads to the death of HSCs. Implementation of quality control at this stage should optimize the safety of HSCs. Our aim was to improve the safety of HSCs by introducing quality control at the stage of introducing DMSO into the HSC leukoconcentrate.

## Materials and methods

The study was conducted with 467 HSC concentrates obtained by means of peripheral blood leukapheresis from 86 patients with hemoblastoses. 167 concentrates comprised

the group before optimization, the experimental group included 300 samples. The final DMSO concentration in cell suspension was 7.5%. Persistence of HSCs and their total colony forming activity (CFU) was expressed as a ratio of cellular indexes after addition of cryoprotectant to the cryopackage and before it. The number of HSCs was assessed as CD34+/CD45dim/7AAD phenotype by flow cytometry (ISHAGE protocol). CFU numbers in HSC population were evaluated after 14-day cultures in (Methocult H4435). Nucleated white blood cells (WBC) were routinely counted by the light microscopy.

## Results

The safety of HSCs was  $79.4 \pm 29.0\%$  in the group prior to optimization. Correlation analysis showed that the safety of HSCs, CFU and the integrity of cell membranes depends on the concentration of WBC (Fig. 1).

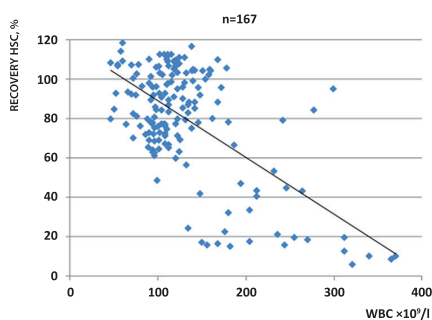


Figure 1A. HSC retention after DMSO administration depending on the concentration of WBC.  $r = -0.64$ ,  $p \leq 0.01$

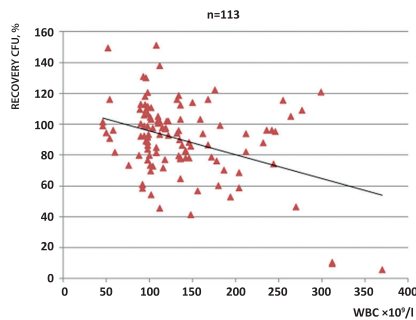


Figure 1B. Preservation of CFU after administration of DMSO depending on the concentration of WBC.  $r = -0.38$ ,  $p \leq 0.01$

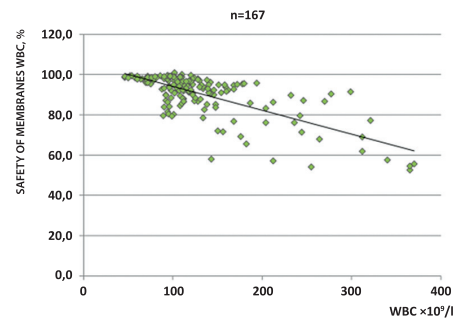


Figure 1C. Preservation of the WBC membranes after DMSO introduction, depending on WBC concentration.  $r = -0.71$ ,  $p \leq 0.01$

In the group of experiments with increased WBC counts  $(150-370) \times 10^9/L$ , the safety of HSCs averaged  $35.5 \pm 28\%$ . To resolve this problem, we suggest optimizing this stage, i.e., before cryoprotectant addition, we diluted the cell suspensions with a plasma expander (rheopolyglukin), in which the concentration of WBC was more than  $150 \times 10^9/L$ . The added rheopolyglucin volume was sufficient to adjust the WBC numbers to  $<150 \times 10^9$  cells/L. After this procedure, the safety of HSCs was increased ( $p \leq 0.05$ ) to  $91 \pm 14.0\%$  (Fig. 2).

## Conclusion

The safety of HSC at the stage of DMSO introducing depends on the concentration of HSC in the leukoconcentrate. Control of WBC numbers and dilution of leukoconcentrates may increase the HSC viability.

## Keywords

Cryopreservation, dimethyl sulfoxide, quality control, hematopoietic stem cells, autologous transplantation.

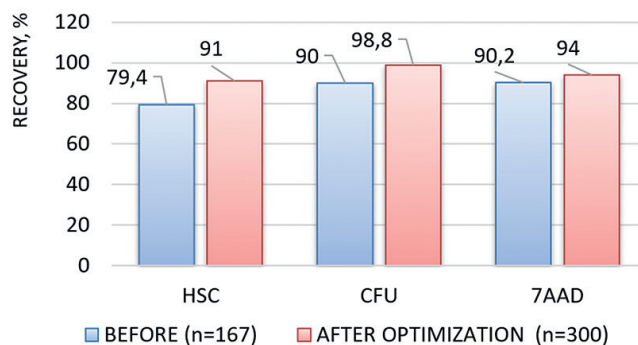


Figure 2. The total change in the HSC, CFU, and intact WBC numbers before and after optimization at the stage of introduction of DMSO

## Результаты внедрения контроля качества на этапе введения диметилсульфоксида в аутологичный трансплантат гемопоэтических стволовых клеток

Евгений В. Коротаев<sup>1</sup>, Андрей А. Степанов<sup>1</sup>, Сергей А. Пономарев<sup>1</sup>, Алексей Н. Косарев<sup>1</sup>, Светлана С. Каракальчева<sup>1</sup>, Елена Е. Зинина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Югорский НИИ клеточных технологий, Ханты-Мансийск, Россия

<sup>2</sup> Сургутская окружная клиническая больница, Сургут, Россия

## Введение

При проведении аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) обычно не учитывается снижение сохранности ГСК на этапе введения криопротектора. Между тем, введение концентрированного диметилсульфоксида (ДМСО) негативно воздействует на клеточные мембраны, что ведет к гибели ГСК. Применение контроля качества на данном этапе позволит оптимизировать сохранность ГСК. Целью работы была оптимизация сохранности ГСК путем внедрения контроля качества на этапе введения криопротектора.

## Материалы и методы

Исследование проведено на 467 концентратах ГСК, полученных путем лейкоцитафереза из периферической крови у 86 пациентов с гемобластомами. 167 концентратов составили группу до оптимизации, 300 – опытную группу. гемобластомами. 167 концентратов составили группу до оптимизации, 300 – опытную группу. Конечная концентрация ДМСО в клеточной взвеси – 7,5%. Сохранность количества ГСК и их суммарная колониеобразующая активность (КОЕ) рассчитывалась как отношение результатов после введения криопротектора в криопакет и до него. Количество ГСК определяли по фенотипу CD34+/CD45dim/7AAD и сохранность мембран ядросодержащих клеток (ЯСК) по фенотипу CD45/7AAD оценивали проточной цитометрией (ISHAGE). Колониеобразующая активность ГСК (КОЕ) оценивали путем их 14-суточного культивирования в системе Methocult H4435 и подсчетом суммарных коло-

ний (КОЕ). Подсчет ядросодержащих клеток (ЯСК) выполнялся с помощью обычной световой микроскопии.

## Результаты

В группе до оптимизации сохранность ГСК составила  $79,4 \pm 29,0\%$ . Корреляционный анализ показал, что сохранность ГСК, КОЕ и целостность мембран клеток зависит от концентрации ЯСК (рис. 1).

В части лейкоконцентратов была повышенной концентрация ЯСК  $(150-370) \times 10^9/л$ , при сохранности ГСК, в среднем,  $35,5 \pm 28\%$ . Для решения проблемы низкой сохранности мы предложили оптимизировать этот этап: перед внесением криопротектора мы разбавляли лейкоконцентраты ГСК реополиглокином – известным плазмозаменителем – до конечной концентрации  $150 \times 10^9/л$  (при концентрации ЯСК  $>150 \times 10^9/л$ ). Благодаря этому сохранность ГСК увеличилась ( $p \leq 0,05$ ) до  $91 \pm 14,0\%$  (рис. 2).

## Заключение

Сохранность ГСК на этапе введения ДМСО зависит от концентрации ЯСК в лейкоконцентрате. Контроль количества ЯСК и разведение лейкоконцентратов позволяет увеличить сохранность ГСК.

## Ключевые слова

Криоконсервация, диметилсульфоксид, контроль качества, гемопоэтические стволовые клетки, аутологичная трансплантация.