

# Instant lysis of therapeutic mesenchymal stem cells after intravenous infusion: role of complement system and in vitro prevention strategies

A. R. Muslimov, R. T. Mikhelashvili, E. V. Volchkov, K. V. Lepik, V. S. Sergeev, B. V. Afanasyev

R. M. Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, The First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St.Petersburg, Russia.

Contact: Dr.Kirill V. Lepik, The First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russia

E-mail: lepikv@gmail.com

## Introduction

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) harbor great potential for cellular and tissue therapy, and are currently under investigation in numerous clinical trials, the majority thereof relying on systemic infusion. A major drawback in MSC-therapy appears to be in the incomplete understanding of fate and function of MSCs following systemic administration. In recent years, new evidence indicates a low biocompatibility of MSC during intravenous infusion. Experimental data may suggest that up to 50% of ex vivo cultured MSCs undergo a complement-dependent lysis upon interaction between the cells and intact human serum. Meanwhile, the data concerning this issue is limited and controversial in some instances. The goal of present study was to assess the MSC viability during intravenous infusion, to confirm the complement-mediated lysis of MSCs, searching for possible ways to overcome this damage.

## Materials and methods

Bone marrow-derived MSCs were obtained from healthy donors. Parallel cultures of MSCs from each donor were performed in two types of media: 1) MEM- $\alpha$  containing 10% FBS, and 2) MEM- $\alpha$  containing 7,5% platelet lysate (PL). When the cultures became near-confluent (>80%), the cells were detached by treatment with trypsin and EDTA. The harvested cells from different media (either PL-, or FBS-supplied) were divided into 3 sub-groups. Group 1: One-hour MSC incubation with 200 $\mu$ l of native (active) serum (a pool of 4 AB(IV), Rh+ donors). Group 2: One-hour incubation of MSCs with serum pre-treated with anti-C5 monoclonal antibody (Soliris<sup>®</sup>, Eculizumab, Alexion Pharmaceuticals Inc.) at the dose of 50 $\mu$ g/ml. Group 3: One-hour MSC incubation with EDTA-inactivated serum (controls).

Cytotoxicity analysis was performed by means of flow cytometry (7-AAD was used for the cell viability assays).

## Results

In our preliminary study, we revealed a statistical significant differences between all 3 groups of cells which were cultured in media containing 10% of FBS. About 30% of freshly harvested MSCs were lysed after 1 hour of contact with active AB(IV) serum. This effect was inhibited with EDTA or Eculizumab, a specific C5 inhibitor, thus providing evidence for a complement-dependent cell lysis. In the series incubated with fetal bovine serum, the average cytotoxicity was 27,9% (subgroup 1), 15,4% (subgroup 2), and 10,7% (subgroup 3,  $p=0,00015$ ). Meanwhile, we could not demonstrate any significant differences between the 3 subgroups of cells cultured with 7,5% human platelet lysate (PL). The average cytotoxicity in the 13.1% for subgroup 1; 15,5% for subgroup 2, and 7,5% for the subgroup 3 ( $p=0,32$ ).

## Conclusions

Our results confirm a phenomenon of pronounced complement-dependent lysis of pre-cultivated MSCs after contact with native serum. By the contrary, MSCs supplemented with human platelet lysate during cultivation showed much lesser (if any) susceptibility to the complement-dependent lysis. Lack of xenoantigens in the PL-containing media may be a possible explanation for this experimental finding.

We also report that pre-treatment of native sera with anti-C5 monoclonal antibody Eculizumab caused a significant reduction of in vitro MSC lysis after their culture in fetal bovine serum, thus suggesting a definite proof for applications of Eculizumab in different areas of cell therapy and transplantation.

## Keywords

Mesenchymal stem cells, transplantation, cellular lysis, complement-mediated.

# Лизис мезенхимальных стволовых клеток после внутривенной инфузии: роль системы комплемента и возможные стратегии предотвращения *in vitro*

А. Р. Муслимов, Р. Т. Михелашвили, Е. В. Волчков, К. В. Лепик, В. С. Сергеев, Б. В. Афанасьев

Институт детской гематологии, онкологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

## Введение

Благодаря своим биологическим свойствам, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются одной из наиболее востребованных клеточных популяций в подходах клеточной терапии и восстановительной медицины. В настоящее время эффективность применения МСК исследуются в сотнях клинических испытаний разных фаз, в большинстве из которых используется их внутривенное системное введение. Все более остро встает вопрос о необходимости понимания распределения, жизнеспособности и функций этих клеток при внутривенной инфузии. Результаты работ последних лет демонстрируют низкую биосовместимость МСК при внутривенном способе введения, и гибель значительного числа культивируемых *in vitro* МСК за счет комплемент-зависимого лизиса. Данные касательно этого вопроса ограничены и зачастую противоречивы. Целью настоящего исследования является оценка жизнеспособности МСК при внутривенном введении, подтверждение наличия комплемент-индуцированного лизиса МСК и поиск возможных способов его преодоления. Материалы и методы. МСК выделялись из образцов костного мозга здоровых доноров (n=6) методом прямого посева. Экспансия МСК от каждого из доноров проводилась на средах двух типов: на МЕМ- $\alpha$ , содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и МЕМ- $\alpha$ , содержащей 7,5% лизата тромбоцитов (ЛТ). Сбор клеток для экспериментов (пассаж 1, 2) проводился при достижении конfluence > 80% путем обработки культуры раствором 0,25% трипсина с ЭДТА. Суспензия клеток каждой из двух групп (ФБС и ЛТ), была разделена на 3 подгруппы. Первая подгруппа клеток инкубировалась с 200 мкл активной человеческой сыворотки в течение 1 часа (пулированная сыворотка от добровольных доноров, AB(IV)Rh+). Вторую группу клеток инкубировали в течение 1 часа с сывороткой, предварительно обработанной анти-C5 моноклональными антителами (Soliris® (Eculizumab) Alexion Pharmaceuticals Inc.) в дозе 50 мкг/мл. Последнюю группу клеток (представленную в

качестве контрольной группы) инкубировали в течение 1 часа с сывороткой, предварительно инактивированной ЭДТА. Анализ цитотоксичности проводился путем проточной цитометрии (в качестве индикатора жизнеспособности клеток был использован краситель 7-AAD). Результаты. Около 30% полученных МСК были лизированы после 1 часа контакта с активной сывороткой. Этот эффект был ингибирован ЭДТА или специфическим ингибитором C5 – Экулизумабом, что доказывает наличие комплемент-зависимого лизиса клеток. В группе ФБС средняя цитотоксичность 1-й подгруппы достигла 27,9%, 2-й подгруппы – 15,4%, и 3-й подгруппы – 10,7% (p=0,00015). Мы не смогли показать статистически значимые различия в 3 группах клеток, культивированных в среде, содержащей 7,5% лизата человеческих тромбоцитов (ЛТ). Средняя цитотоксичность в 1-й подгруппе была 13,1%, 2-й – 15,5, 3-й – 7,5% (p=0,32).

## Выводы

Полученные результаты подтверждают наличие феномена массивного комплемент-зависимого лизиса культивированных МСК после контакта с цельной сывороткой крови. МСК с добавлением лизата тромбоцитов в процессе культивирования показывают значимо меньшую восприимчивость или полное её отсутствие к комплемент-зависимому лизису. Одним из возможных объяснений этого наблюдения может быть отсутствие ксеноантигенов в средах, содержащих ЛТ. Инкубирование активной сыворотки с анти-C5 моноклональными антителами (Экулизумаб) значительно снижает лизис МСК, культивированных с добавлением ФБС, что демонстрирует возможный потенциал использования Экулизумаба в области клеточной терапии и трансплантации.

## Ключевые слова

Мезенхимные стволовые клетки, трансплантация, лизис клеток, комплемент-опосредованный.