

## UTILITA' E LIMITI DEL TEST DI VITALITA' DELLE PBSC (Periferal Blood Stem Cell) CRIOPRESERVATE

Silviano Gentili; Urso Provvidenza

Laboratorio di manipolazione e crioconservazione Cellule Staminali Emopoietiche- A.O. San Camillo-Forlanini, ROMA

**Premessa:** Le cellule del midollo osseo che hanno l'espressione dell'antigene CD34, sono capaci di ricostituire le linee cellulari ematopoietiche dopo terapia mieloablattiva. Le cellule CD34+ si trovano anche nel sangue periferico in misura estremamente ridotta (approssimativamente 0.01-0.05% delle TNC). Attualmente il trattamento di mobilizzazione che include chemioterapia e /o i fattori di crescita delle cellule ematopoietiche, permette un significativo incremento delle cellule staminali CD34+ in pazienti e in donatori sani. Le cellule staminali periferiche autologhe (PBSC) hanno in parte sostituito il midollo osseo come fonte primaria di cellule staminali (Fig 1), mentre è in aumento l'uso di trapianto allogenico di PBSC tra HLA compatibili (fig.2).

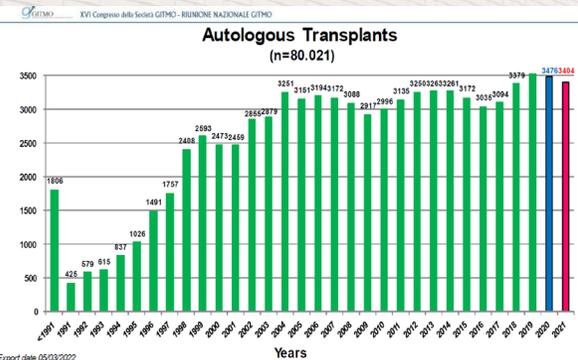


Grafico 1

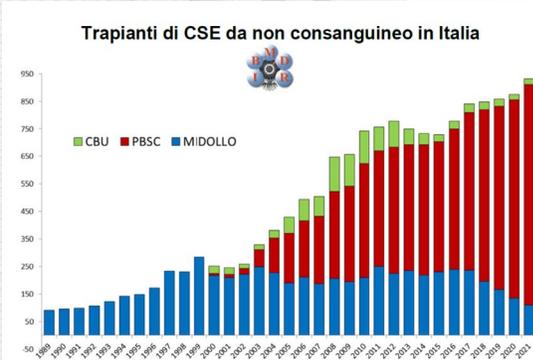


Grafico 2

I potenziali vantaggi del trapianto di PBSC consistono in una più rapida ricostruzione del tessuto ematopoietico e un ridotto rischio di contaminazione di cellule tumorali. Inoltre l'aumento dei linfociti-T e delle cellule NK rispetto ad un trapianto di midollo, aumentano la GVL anche se hanno la possibilità di aumentare la GvHD,. Inoltre si elimina la necessità di effettuare una anestesia generale e la raccolta di PBSC è più adattabile alle manipolazioni come la selezione di CD34+ e la crioconservazione.

Routinariamente le CD34 vengono quantificate e qualificate tramite la citometria a flusso che determina e conferma l'adeguatezza della raccolta delle PBSC. La soglia minima nell'adulto è compresa tra 2 e 5 x 10<sup>6</sup> pro Kg di peso corporeo ed è stato osservato che con questi valori si ha un adeguato attecchimento. Premessa la fondamentale importanza di avere dei sistemi di rilevazione validi delle cellule CD34+ al fine di ottenere un preciso valore di conta iniziale di quest'ultime, dei parametri di vitalità prima della delicata fase di congelamento e crioconservazione, entriamo nel merito del test di vitalità susseguente alla crioconservazione.

**Obiettivo:** L'obiettivo di questo lavoro è dimostrare l'importanza del rapporto tra la vitalità delle CSE nelle vials e quella delle CSE residue nelle unità infuse ai fini della validazione dell'intero processo di raccolta, manipolazione, crioconservazione e infusione per il trapianto delle CSE nell'ambito di un «validation master plan» nel quale si delineano i principi coinvolti nella qualificazione di una struttura, definendo le aree e i sistemi da convalidare, fornendo un programma scritto per il raggiungimento e il mantenimento di una struttura qualificata.

**Materiali e Metodi:** Attualmente un sistema per rilevare la vitalità di CD34 consiste nella tecnica citofluorimetrica utilizzando la 7AAD (7 amino-actinomicina D) colorante "vitale" perché viene escluso dalle cellule vive (Fig.1), in cui la membrana plasmatica è integra e non ne permette l'entrata. La 7-AAD è eccitabile con il laser ad Argon a 488 nm, ed emette fluorescenza a 670 nm (FL3).

Un altro sistema in uso è la rilevazione della vitalità tramite il colorante Tripan Blu (Fig.1). Blu benzamina, Blu naftilammina, Blu Niagara) sintetizzato agli inizi del novecento come derivato del toluene, deve il suo nome alla proprietà di essere tossico per il parassita tripanosoma (analoghi del trypan blue sono attualmente usati come agenti farmacologici).

Il Trypan Blue viene comunemente usato nella colorazione vitale con un metodo definito come colorazione per esclusione. Infatti, le membrane cellulari sono normalmente impermeabili a tale colorante, mentre le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, si colorano di blu senza possibilità di distinzione. La conta viene effettuata in microscopia ottica con camera di Nageotte. La quantità di cellule che vengono contate è limitata e non è possibile distinguere le CD34 dalle altre cellule nucleate. Nell'analisi citofluorimetrica invece è possibile la conta di migliaia di cellule identificate dal marcatore CD34.

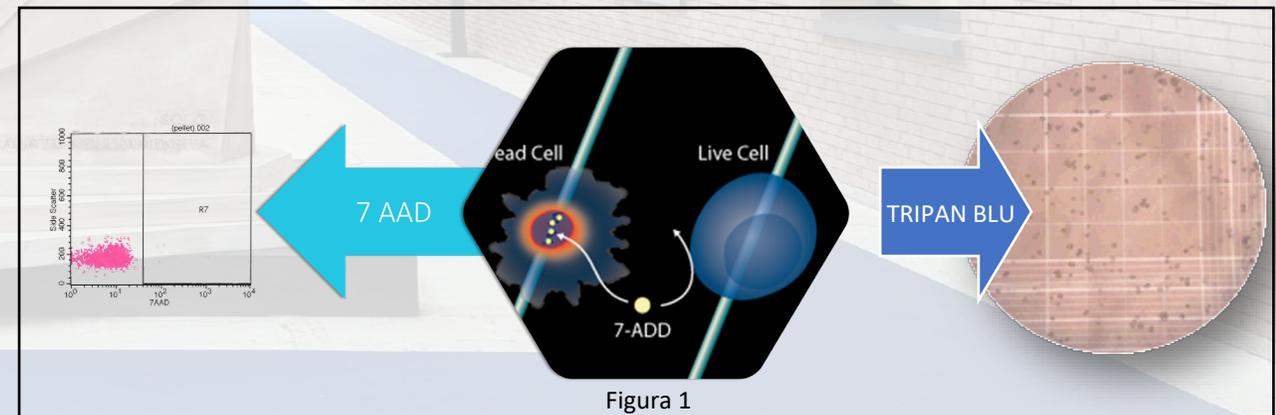


Figura 1

**Discussione: Vitalità test fondamentale**

Dal momento in cui l'unità della raccolta di PBSC viene portata al Laboratorio di Manipolazione e Crioconservazione fino al momento in cui verrà infusa devono essere verificate tutte le fasi critiche al fine di fornire un prodotto terapeuticamente valido e il più possibile vicino alle aspettative.

La fase iniziale prevede tramite conta citofluorimetrica la verifica del raggiungimento del "Target", ossia della quantità di cellule CD34 vitali pro chilo necessarie; questo valore di partenza sarà il punto di riferimento delle conte cellulari durante le fasi di manipolazione di crioconservazione, scongelamento e infusione.

Insieme alla vitalità è importante verificare la **capacità funzionale** dei progenitori emopoietici tramite il potenziale clonogenico ossia la capacità in vitro delle CSE di riprodurre se stesse. (fig. 2)

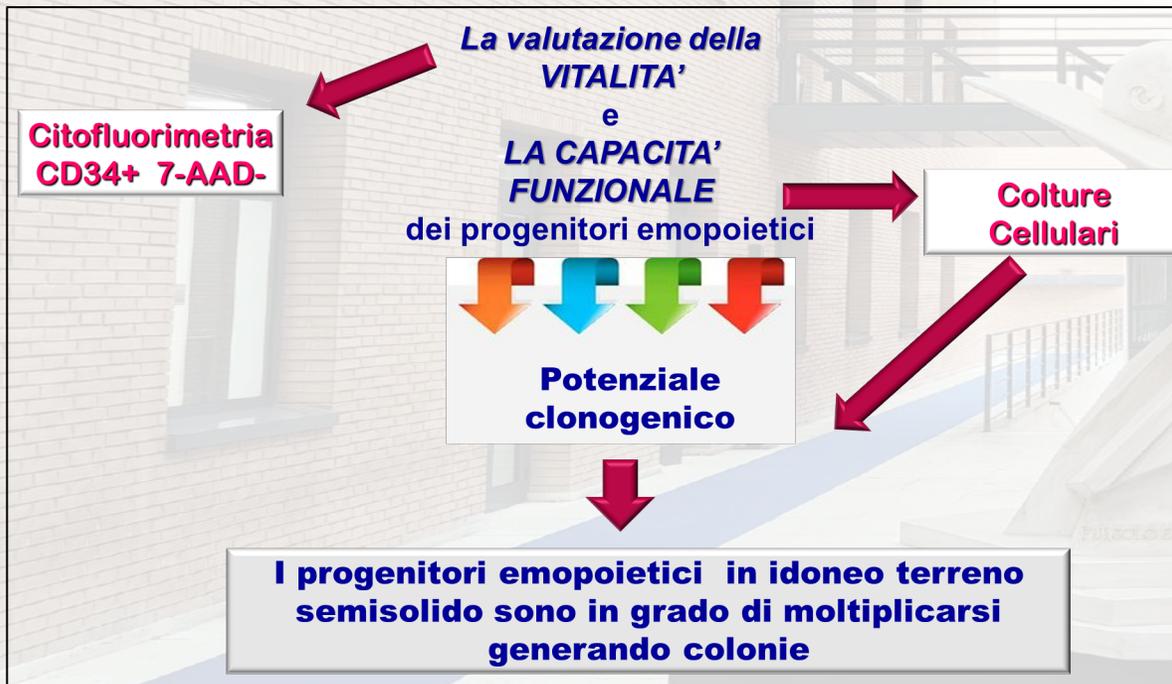


Figura 2

SITLaB - Società Scientifica Italiana dei TSLB

Normalmente per ogni criobag si allestiscono due vials di prodotto in cui vengono immessi 0.5ml di quest'ultimo; come ulteriore controllo di validazione, su 8 unità è stata prelevata una vials in più con la stessa aliquota di prodotto al fine di verificarne la vitalità cellulare a 24 ore dal congelamento(Fig.3) confrontandola con i valori di CD34 post raccolta (Grafico 3).

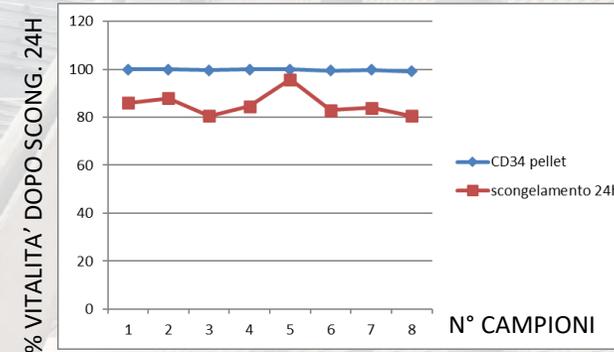


Grafico 3

I risultati a 24 ore rientrano tutti nel valore atteso di vitalità delle CD 34  $\geq$  all'80%



Figura 3

Oltre ai Controlli di Qualità della vitalità cellulare effettuati al fine di validare il prodotto è altrettanto importante e necessario avere la certezza che il prodotto ci fornisca i risultati attesi effettuando quei controlli che ci permettono di convalidare l'intero processo di produzione nell'ottica di un "Validation Master Plan". Quest'ultimo contempla la presenza di requisiti idonei per consentire lo svolgimento di tutte quelle attività svolte nel Laboratorio di Crioconservazione secondo gli standards europei del JACIE e FACT e delle linee guida EDQM come gli ambienti a contaminazione controllata, il controllo di sterilità microbiologica del processo, l'impianto di N2L, il controllo dei tank di crioconservazione e la presenza di DPI individuali e collettivi.

Lo schema sottostante raccoglie i punti critici in cui si effettuano i CQ sia per il prodotto sia per la validazione del processo; come si può notare essi procedono di pari passo per i parametri della sterilità microbiologica e della conta delle TNC (rispettivamente freccia rossa e freccia viola) mentre per il test della conta e della vitalità delle CD34 (freccia verde), abbiamo due steps in più riguardanti la validazione del processo e precisamente subito dopo aver aggiunto al prodotto la soluzione criopreservante (poco prima del congelamento a discesa programmata) e, come precedentemente accennato, dopo 24 ore dal congelamento.

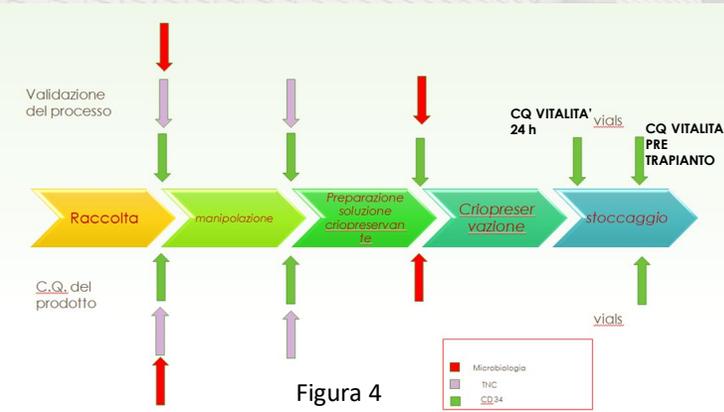


Figura 4

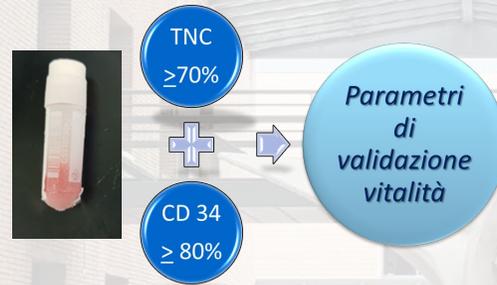


Figura 5

Figure 4 e 5: FASI DELLA CONVALIDA DEL PROCESSO DI MANIPOLAZIONE E CRIOPRESERVAZIONE E relativi parametri

- **Raccolta:** immediatamente dopo la raccolta aferetica si effettua un prelievo del prodotto per i test di sterilità microbiologica, per la conta delle TNC e CD34 (conta e vitalità); in questa prima fase avremo i valori di partenza e la verifica del target di raccolta.
- **Manipolazione:** dopo la riduzione di volume per centrifugazione, è necessario sapere se il numero delle TNC e delle CD34 ha subito variazioni negative rispetto alla quantità iniziale per cui si rende necessario il prelievo di un altro campione dalla raccolta concentrata e risospesa.
- **Preparazione soluzione criopreservante:** Fase molto delicata ed importante poiché come già detto l'aggiunta della soluzione criopreservante con DMSO al prodotto trasferito nelle criobag di congelamento è critica, per cui ai fini della validazione del processo, si rende necessario verificare che le modalità di aggiunta della soluzione criopreservante non alteri il numero e la vitalità delle CD34 per cui oltre al prelievo per la sterilità post manipolazione, si effettua un prelievo per la vitalità pre trapianto direttamente da ogni singola criobag.
- **Criopreservazione:** le criobag vengono sottoposte insieme alle rispettive vials, al congelamento a discesa programmata (PLANER) e stoccate nei tank contenenti azoto liquido a -196°C

Un'altra vial viene scongelata alcuni giorni prima dell'infusione delle PBSC su richiesta del reparto di Ematologia, per verificare il CQ della vitalità pre infusione. Qualora sia programmata la convalida del processo, è necessario fare la vitalità delle CD34 dal residuo della unità infusa per rapportarlo con il valore ottenuto dalla vial di controllo. Per la validazione del processo tale rapporto deve essere compreso tra 0.80 e 1.10 (grafico 4) almeno nel 75% dei campioni mentre nel 100% tale rapporto non deve superare 1.30. Nella nostra validazione del processo tutte le unità testate a scopo di validazione hanno rispettato questi parametri.

**Risultati:** Nel confronto tra la vitalità delle vials e del prodotto si ottiene una «RATIO» di 0,97 perfettamente in linea con i parametri di validazione (vedi tabella)

Unità /vial	vials	product	ratio
10200945/1	100	99,4	1,006036
10150019/1	98,77	98,59	1,001826
10200019/2	98,75	98,23	1,005294
10200026/2	99,2	92,5	1,072432
10200053/1	99	90	1,1
10200054/1	99	95,7	1,034483
10200071/1	98,46	99,9	0,985586
10200071/2	85,22	97,15	0,8772
10200096/1	97,14	96,3	1,008723
10200121/1	99,9	96,04	1,040192
10200122/1	99,3	98,04	1,012852
10200144/1	96	98	0,979592
10200144/2	97	97	1
10200119/1	97,67	95,5	1,022723
10200120/2	90,5	97,71	0,92621
10200125/1	91,38	97,3	0,939157
10200126/1	97,34	97	1,003505
11200102/1	96,59	96,54	1,000518
11200104/2	96,25	96,21	1,000416
11200132/1	90,54	94,8	0,955063
11200133/1	92	92,7	0,992449
11200163/1	93,78	90,82	1,032592
11200141/2	95,75	84,46	1,133673
11200141/3	94,31	88,02	1,071461
MEDIA	97,07	96,42	0,971567



Grafico 4

**Conclusioni:**

Nel settore del trapianto di precursori emopoietici richiamiamo il controllo delle cellule CD34+ sia nei prodotti ad uso autologo che allogenico. Le cellule staminali emopoietiche possono essere identificate e quantificate all'interno della popolazione dei leucociti, marcati con l'anticorpo monoclonale (MoAb) anti-CD45, tramite un MoAb diretto verso l'antigene CD34 espresso sulla superficie di questi precursori. L'analisi al citofluorimetro viene effettuata secondo il **protocollo ISHAGE**, standardizzato e condiviso dalla maggior parte dei centri trapianti, con conta assoluta in singola piattaforma.

Tuttavia sono presenti anche dei limiti che sono a tutt'oggi oggetto di discussione nella comunità scientifica; lo stato delle cellule apoptotiche, necrotiche o danneggiate non viene distinto con conseguente impossibilità di valutazione delle cellule apoptotiche che in realtà per il loro stadio di apoptosi, potrebbero virare verso la vitalità.