



# TotiCyte - промяна в парадигмата за изолация и съхранение на стволови клетки от умбиликална кръв

Джеф Дрю, Рейчъл Слотър, Александър Климентов, Вейн М. Шанън, Клаудия Рийс, Уилям Харингтън, Мегън Уотс и Лесли-Ан Мартин\*

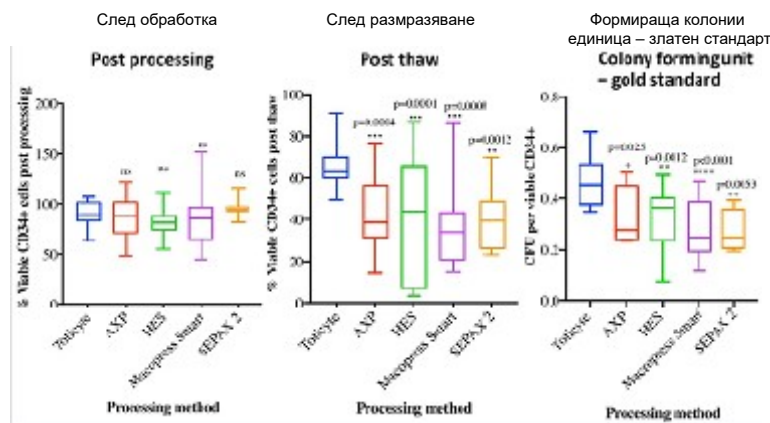
Cyte Tech ООД, Серади 2 и 3 Оук Хаус, Офис Парк Уудландс, ул. Албърт, Бъргаис Хил, RH15 9TN, Обединено Кралство

## Графично резюме

Методът TotiCyte за разделяне на умбиликална кръв  
отделя над 99% от еритроцитите



Сравнителен ефект върху възстановяването на CD34<sup>+</sup> клетки



## Резюме

**Цели:** Съхранението на умбиликална кръв за терапевтично приложение посредством редукция на обема е добре установено, но значителната загуба от фракцията на белите кръвни клетки по време на обработката и замразяването остава проблематична. Тук описваме валидацията на TotiCyte, нов реагент, който отстранява >99% от еритроцитното съдържание без центрофугиране и подобрява възстановяването след затопляне.

\*Автор за кореспонденция: Лесли-Ан Мартин, Cyte Tech ООД, Сгради 2 и 3 Оук Хаус, Офис Парк Уудландс, ул. Албърт, Бъргис Хил, RH15 9TN, Обединено Кралство, имейл: [lessley-ann@cytetechnology.com](mailto:lessley-ann@cytetechnology.com)

Цитиране: Drew J, Slaughter R, Klimentov A, Channon WM, Rees C, et al. (2021) TotiCyte, a Paradigm Shift in Stem Cell Isolation and Storage from Umbilical Cord Blood. J Stem Cell Res Dev Ther 7: 073.

Получено на: 14 май 2021; Прието на: 25 май 2021; Публикувано на: 01 юни 2021

**Авторски права:** © 2021 Дж. Дрю и съавтори. Това е статия със свободен достъп, която се разпространява в съответствие с условията на Лиценза за съзидателно споделяне, който позволява неограничено ползване, разпространение и репродукция на всякакви медии при условие, че авторът и източникът са упоменати.

**Материали и методи:** Умбиликална кръв беше обработена посредством TotiCyte, хидроксиетил нишесте (ХЕН), AXP, Sepax 2 или MacoPress Smart, за да може да се осъществи сравнение. Жизнеспособността беше оценена посредством поточна цитометрия за CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>. Беше проведено изследване на формиращи колонии единици, за да се установи възстановяването след затопляне.

**Резултати:** TotiCyte отстрани > 99% от еритроцитната фракция, като същевременно поддържащо добро възстановяване на CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> клетките. Между тестваните системи не беше наблюдавана значима разлика в жизнеспособните CD34<sup>+</sup> клетки след обработката. След затопляне обаче, възстановяването на жизнеспособни CD34<sup>+</sup> клетки посредством TotiCyte беше значимо по-изразено (66.24% CO ± 9.9) в сравнение с AXP (42.42% CO ± 17.1), ХЕН (41.05% CO ± 27.4), MacoPress Smart (37.92% CO ± 20.9) и Sepax 2 (40.02% CO ± 14.0). Анализ с поточна цитометрия показва 1.4 - до 1.7-кратно увеличение на жизнеспособните CD34<sup>+</sup> клетки посредством TotiCyte спрямо другите технологии. Като цяло TotiCyte допринесе за 2.2 до 3.0-кратно подобрене във възстановяването на CD34<sup>+</sup> клетките.

**Заключение:** Представихме доказателства в подкрепа на употребата на TotiCyte като нова технология за редуциране на обема, способна да подобри значимо възстановяването на CD34<sup>+</sup> клетките.

## Въведение

Трансплантацията на стволови клетки е използвана с огромен ефект за лечение на тежки болестни състояния. Съществуват няколко източника на стволови клетки за трансплантация като мастна тъкан, костен мозък и периферна кръв, подложена на афереза. Независимо от това, умбиликалната кръв (УК) се счита за най-добрия източник на стволови клетки заради асоциираните ѝ ползи, в това число по-ниска честота на остра реакция на трансплантант срещу приемник и толерантност към парциално съответствие по HLA между донор и реципиент [1-3].

Въпреки това, употребата на трансплантанти от УК при по-едри индивиди е ограничена поради ограничения в дозата на клетките, което се смята за единствения най-голям недостатък на използването на УК [1, 4-5]. За преодоляването на това ограничение са предлагани разнообразни стратегии, включително използване на двойни трансплантанти от УК [6-9], при които се комбинират несвързани УК с идентични по хаплотип стволови клетки от периферна кръв [10,11], както и провеждане на директна инфузия, прескачайки стъпките на отмиване. Някои от тези изследвания са демонстрирали позитивни резултати [12-13].

С въвеждането на забавено клампиране на пъпната връв, за което са демонстрирани ползи за развитието както Световната Здравна Организация, Американската Академия на Педиатрите и Кралския Колеж по Акушерство и Гинекология; обемът на УК става по-малък. Вероятно е, това да утежни ограниченията с клетъчната доза.

Правени са неколкочатни опити да се разработят методи, които да позволят по-ефективно клетъчно възстановяване и да подобрят криогенното съхраняване на УК; така или иначе всеки от тях има недостатъци [12-21]. Тези методи включват техники за съхранение на цяла кръв и за редуциране на обема, при което или се премахва по-голямата част от еритроцитното съдържание, за да се изолира селективно слой от левкоцити и тромбоцити (редукция в обема за премаване на еритроцити - РОПЕ), или се редуцира плазмата, а се запазва еритроцитната фракция (редукция в обема посредством отстраняване на плазма - РООП). Докато РООП води до минимална загуба на ядрени клетки, приложението му е асоциирано със свързани с трансфузията странични ефекти [22], а други методи за редуциране на обема документират загуба на ядрени клетки в размер до

40% [14]. В допълнение, всички методи за редуция на обема водят до попадане на значителен брой еритроцити във фракцията на белите клетки. В някои случаи еритроцитното съдържание може да надвиши 50% от получения продукт.

За да адресираме тези недостатъци, ние разработихме нов реагент, TotiCyte, и сравнихме ефикасността му с други методологии, използвани от и от частни, и от публични банки за складиране на УК. Изследваните параметри включваха възстановяването на различни клетъчни типове (CD34<sup>+</sup> клетки, CD45<sup>+</sup>), способността за формиране на колонии посредством изследване на (формиращи колонии единици)-гранулоцити–моноцити (ФКЕ-ГМ), ФКЕ-еритроцити (ФКЕ-Е), ФКЕ-гранулоцити–еритроцити–моноцити–мегакариоцити (ФКЕ-ГЕММ), общ ФКЕ и хематокрит.

Като цяло TotiCyte изглежда по-добър, елиминирайки >99% от еритроцитната фракция и значимо подобрявайки възстановяването на жизнеспособните CD34<sup>+</sup> стволови клетки след затопляне. Последното може да се окаже най-важното подобрене, наблюдавано при използването на TotiCyte и се изразява в изследване на формиращи колонии единици (ФКЕ), широко приети като “златен стандарт”, обозначаващ полезност за клиниката [23].

### **Материали и методи**

Прясната умбиликална кръв, комбинирана с цитрат фосфат декстроза аденин (ЦФДА) (n=76) беше закупена от Cells4Life LLP и складиран на 4 °C при получаването и беше обработен <48 часа. Обработените обеми на пробите бяха оптимални за всяка от сравняваните системи. Преди обработването 500 µl, проба от цяла кръв беше взета за анализ и послужи за база изчисляване на клетъчните загуби. След обработката и след затопляне бяха взети още проби за сравняване на различните технологии.

### **Технологии на обработване и криогенно съхранение**

#### **TotiCyte**

TotiCyte е съобразено с Европейските директиви медицинско устройство, което се състои от декстран 500 (2.5% (w/v)), диметил сулфоксид (DMCO) (2.5% (v/v)), комбинирани с буферизиран с фосфат физиологичен разтвор. Еднакъв обем от TotiCyte беше добавен към кръвта от пъпната връв/цитрат-фосфат-декстрозния разтвор и към втора банка, прикрепена към първата. Всички портове бяха затворени. Пробата беше разбъркана чрез внимателно обръщане и банката с кръв беше окачена на стойка за 30 минути, което позволи образуването на еритроцитни стълбчета. След това банката с кръв беше притисната посредством преса Mikromatic при ръчна настройка. Съответните портове бяха отворени и беше упражнено налягане върху банката с умбиликална кръв. Богатата на бели кръвни клетки плазма беше отлята във втората банка. При навлизане на еритроцитите в маркуча ключалките бяха затворени. Втората банка, съдържаща фракцията на белите кръвни клетки беше центрофугирана на 750 x g за 20 минути до седиментирането на клетъчната фракция. Плазмата беше изцедена, като остана между 20-25 ml, в която клетъчната утайка беше суспендирана отново. Проба от 500 µl беше изтеглена със спринцовка и обозначена след обработката. Обемът клетки беше регулиран да съдържа 7.5% DMCO (CryoSure-DEX40 - 55% w/v диметил сулфоксид, 5% w/v декстран 40. WAK-Chemie Medical GmbH). След добавянето на криопротектант пробите с умбиликална кръв бяха подложени на контролирано по скорост -1°C/минута замразяване. След 24 часа пробите бяха поставени в течен азот за дълготрайно съхранение.

#### **ХЕН**

Хидроксиетил нишесте (6% разтвор (Baxter, Deerfield, IL)) беше добавено към кръвта от пъпната връв/цитрат-фосфат-декстрозния разтвор в 30% от обема на кръвта/цитрат-фосфат-декстрозния разтвор. Този разтвор беше разбъркан чрез обръщане на банката с кръв няколко пъти. Банката беше окачена за 60 минути, за да се позволи на кръвния разтвор да се отдели под въздействието на гравитацията. Богатата на бели кръвни клетки плазма беше отделена във втора банка, която беше центрофугирана на 750 x g за 20 минути, за да седиментира клетъчната фракция. Плазмата беше изстискана, като бяха оставени между 20-25 ml, в които беше суспендирана клетъчната утайка. Обемът клетки беше регулиран да съдържа 10% DMCO (CryoSure-DEX40) преди замразяването при контролирана скорост от -1°C/минута.

### **Серох 2 (автоматично устройство на базата на центрофуга)**

Serax 2 автоматична система за сепариране, контролирана от компютърен софтуер. Машината концентрира слой от левкоцити и тромбоцити, богат на хемопоетични стволови клетки от 35-290 ml умбиликална кръв в краен обем 10-50 ml. В това изследване беше използван краен обем 20 ml. Всяка единица умбиликална кръв беше разделена посредством еднократен кит, поставен в апарата. Всяка проба беше завъртяна на 1900 x g и обработена съобразно инструкциите на производителя. Както и преди, бяха взети проби от преди и след обработката за по-нататъшен анализ. Преди замразяването при контролирана скорост  $-1^{\circ}\text{C}/\text{минута}$  към пробите беше добавен ДМСО до крайна концентрация 10% (CryoSure-DEX40).

#### **MасоPress smart**

MасоPress е автоматична система за редукция на обема, която използва оптика, за да определи позицията на еритроцитната фракция. Машината концентрира слоя от левкоцити и тромбоцити от кръвен обем  $>50$  ml. На кратко, VRT0000XU (система от горна и долна банка Masopharma) беше свързана към събирателна банка посредством спайк и съдържанието се изцеди в централната банка на трибанковата система. Банката беше центрофугирана на 2200 x g за 18 минути. След това параметрите на МасоPress бяха настроени според инструкциите на производителя, за да се получи краен обем от 21 ml. Получената проба беше регулирана до 10% ДМСО (Cryo-Sure-DEX40) преди замразяването.

#### **АХР**

Платформата АХР също използва технология с оптичен сензор, за да получи прецизно разделяне и запазване на таргетната популация от моноклеарни клетки. Минималният обем, който може да бъде обработен е 40 ml. Редукцията на обема беше проведена, както беше описано в инструкциите на производителя, за да се получи краен обем между 20-21 ml. Получената проба беше регулирана до 10% ДМСО (CryoSure-DEX40) преди замразяването с контролирана скорост от  $-1^{\circ}\text{C}/\text{минута}$ .

#### **Измерване на хематокрит**

Кръв от преди и след обработката беше изтеглена в хематокритни епруветки до приблизително напълване на епруветките приблизително две трети. Епруветката беше обърната бавно, за да се позволи на кръвта да се придвижи до дъното на епруветката. Отворът на епруветката беше запечатан с херметизиращ материал. Епруветката беше огледана за сигурност, че няма никакъв или малко въздух сред кръвната колона. Епруветките бяха центрофугирани на 5000 x g за 5 минути. Посредством линия беше измерена височината на еритроцитния стълб и разделена на височината на кръвна колона (клетки и плазма). Тази стойност беше умножена по 100%, за да се получи хематокрита.

#### **Поточна цитометрия и клетъчно броене**

Възстановяването на ядрените клетки беше изследвано посредством хематологичен анализатор (Horiba, UK) съгласно инструкциите на производителя. Беше проведен поточен цитометричен анализ посредством апарат Becton Dickinson (BD) FACS Caliber, използващ епруветки TruCount. За кръвните проби шлюзовете бяха настроени съобразно условията за контрол на стволови клетки  $\text{CD}34^{+}$  в цяла кръв (BD, каталожен номер: 340991). Пробите бяха подготвени, както следва: 100  $\mu\text{l}$  кръв беше добавена в епруветка TruCount, съдържаща 20  $\mu\text{l}$  смес от антитела  $\text{CD}34^{+}/\text{CD}45^{+}$  и боя за жизнеспособност 7AAD (5  $\mu\text{l}$ ). След това епруветките бяха инкубирани на стайна температура на тъмно за 20 минути. След това клетките бяха лизирани посредством лизиращ буфер BD FACS.

#### **Анализ след затопляне и изследване на формиращите колонии единици (ФКЕ)**

Замразени аликвоти (1.5 ml) от обработените проби бързо бяха затоплени до  $37^{\circ}\text{C}$ . Беше проведено активирано от флуоресценция клетъчно сортиране (FACS анализ), за да се установи броят на жизнеспособните  $\text{CD}45^{+}$  и  $\text{CD}34^{+}$  клетки след затоплянето. ФКЕ анализът беше проведен, за се оцени съдържанието на стволови и прогениторни клетки. В случая на АХР, Serax 2 и МасоPress Smart, беше използван Lymphoprep, за да се отстрани контаминиращата фракция на еритроцитите, последвано от поточна цитометрия, за да се определят жизнеспособните  $\text{CD}45^{+}$  клетки след екстракцията. След това жизнеспособните  $\text{CD}45^{+}$  клетки бяха разреждени в DMEM-F12 (Gibco UK), съдържащ 2% фетален телешки серум (Gibco UK) до финална концентрация от  $1.5 \times 10^5$  клетки/ml. Аликвота от 0.3 ml беше комбинирана с 3 ml Methocult (StemCell, UK) съобразно инструкциите на производителя. Получената проба беше пипетирана поравно в две гнезда на 6-гнездна плочка. Останалите празни гнезда бяха напълнени със стерилна дестилирана вода.

Плочките бяха инкубирани на 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и >95% влажност за 14 дни. След това колонии бяха охарактеризирани въз основа на морфологията в: BOE-E – Взрив образувачи единици - еритроидни, състоящи се от над 20 еритробласти в единични или множествени клъстърци. ФКЕ-ГМ – формиращи колонии единици - гранулоцити, макрофаги, в които колонии се съдържат поне 20 гранулоцита и или макрофаги. ФКЕ-ГЕММ – формиращи колонии единици гранулоцити, еритроиди, макрофаги, мегакариоцити. Те се състоят от прогенитори, които продуцират еритробласти и поне два други разпознаваеми клона. ФКЕ-ГЕММ обикновено произвеждат големи колонии от >500 клетки.

### Анализ на данните

За да определим вариабилността, средното възстановяване на CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> както след процесирането, така и след затоплянето бяха изразени релативно на началния материал от цяла кръв, който беше приет за 100%. За анализа на формиращите колонии единици беше прието, че една жизнеспособна CD34<sup>+</sup> е способна да генерира една колония. Това позволи да бъде изчислено съотношението на действителни ФКЕ/предвидени ФКЕ. За да премахнем смущаващи фактори при сравняването на съотношенията, за по-нататъшния сравнителен анализ бяха използвани само предвидени ФКЕ над 100.

### Статистически анализ

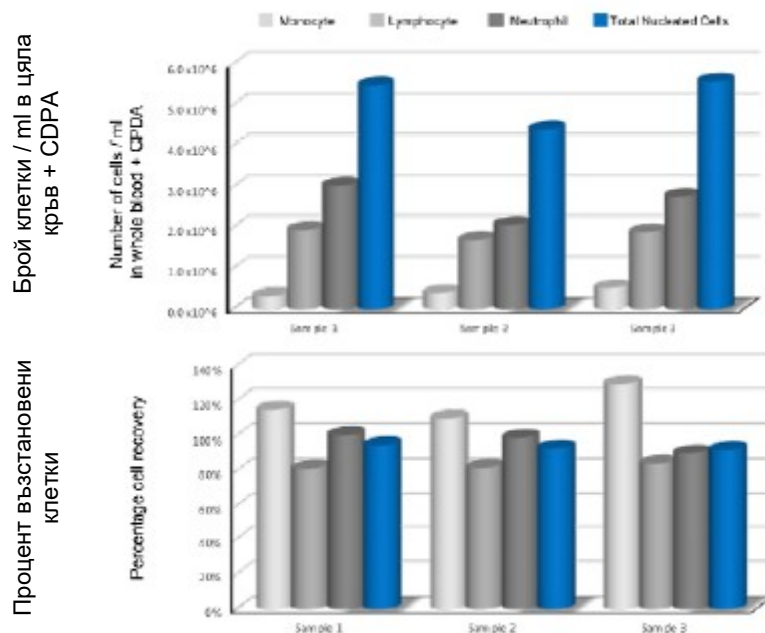
Беше проведен тест за нормалност посредством Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk. Беше проведен анализ на аутлайърите посредством ROUT. За множествени сравнения беше проведен теста на Dunnett's, като се изчислиха t-тест на Student за всяко лечение, където теста сравнява лечебната група с единствена контролна група, в този случай TotiCyte.

### Резултати

#### TotiCyte ефективно възстановява ядрени и мононуклеарни клетки

За да преценим способността на TotiCyte да възстановява ядрени клетки от човешка кръв, пробите (n=3) бяха обработени и анализирани за различни клетъчни популации посредством хематологичен анализатор. Общото възстановяване на ядрени клетки беше >90%, от които се наблюдаваха 100% моноцити, 80% лимфоцити и 90% неутрофили (Допълнителна фигура S1).

#### Възстановяване на ядрени клетки в човешка периферна кръв



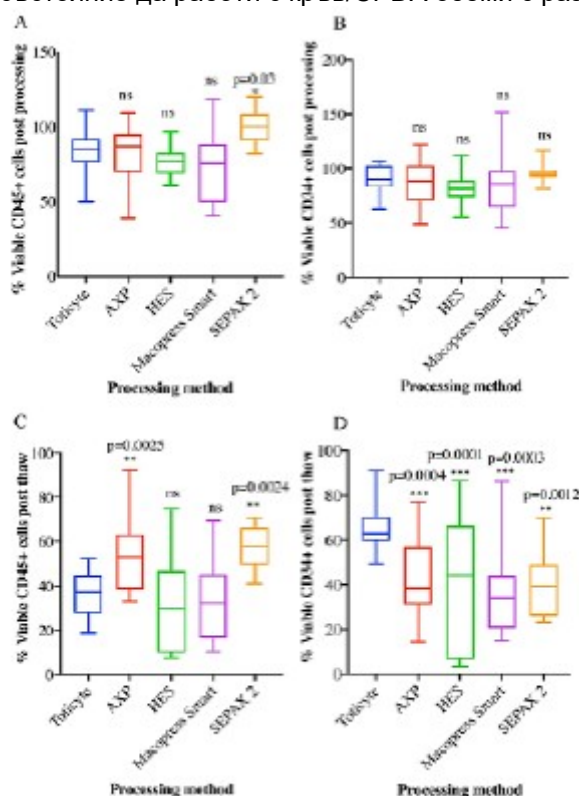
Допълнителна фигура S1: TotiCyte ефективно възстановява общите ядрени и едноклетъчни клетки.

**Сравнение на възстановяването след обработка на жизнеспособни CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> клетки, за да се изследват клетъчните групи на хематологичните стволови и прогениторните клетки**

Сравнение на възстановяването на жизнеспособни CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> клетки посредством TotiCyte, AXP, HES, MacoPress Smart или Sepax 2 беше проведено посредством поточна цитометрия. Минималния обем кръв/обработена с CPDA посредством TotiCyte или HES беше 30 ml, за AXP минималния обем беше 40 ml и за MacoPress Smart и Sepax 2, 50 ml. Всички данни за изразени в отношение към цялата кръв преди обработката. Средните възстановявания на жизнеспособни CD45<sup>+</sup> (Фигура 1A) бяха: TotiCyte (84.79%, CO ± 12.6, n=24), AXP (80.90%, CO ± 19.4, n=18), HES (76.48%, CO ± 9.3, n=19), MacoPress Smart (71.97%, CO ± 22.7, n=11) и Sepax 2 (99.38%, CO ± 11.9, n=10). Не беше наблюдавана значима разлика във възстановяването след обработка на жизнеспособни CD45<sup>+</sup> клетки, с изключение на Sepax 2 (p=0.02).

Изследването на възстановяването на жизнеспособни CD34<sup>+</sup> клетки след обработката не показва значими разлики между технологиите със средно възстановяване за TotiCyte (89.76, CO ± 11.9, n=24), AXP (87.28%, CO ± 19.6, n=18), ХЕН (82.15%, CO ± 13.6, n=19), Maco-Press Smart (86.77%, CO ± 27.9, n=11) и Sepax 2 (95.02%, CO ± 8.9, n=10) (Фигура 1B). Трябва да се отбележи, че общата загуба на хемopoетични прогениторни клетъчни популации за всички технологии в това изследване беше средно 11.8%, което е под докладвани предшествващи оценки 14- 42% [14].

Взети в цялост тези данни загатват, че последващата обработка с TotiCyte е също толкова ефективна, колкото и настоящите индустриални и здравни стандартни технологии за кръвни банки за умбиликална кръв и е в състояние да работи с кръв/CPDA обеми с размер от 30 ml.



**Фигура 1:** Сравняване на обработката с TotiCyte с тази с AXP, Sepax 2, ХЕН и MacoPress Smart. Диаграмата тип "кутия" показва възстановяването след обработка на А. CD45<sup>+</sup> и В. CD34<sup>+</sup> клетки за TotiCyte (n=24), AXP (n=18), ХЕН (n=19), Sepax 2 (n=10) и MacoPress Smart (n=11). Възстановяването след затопляне на С. CD45<sup>+</sup> и D. CD34<sup>+</sup> за възстановяванията след затопляне с TotiCyte (n=24), AXP (n=18), ХЕН (n=19), Sepax 2 (n=10) и Maco-Press Smart (n=11). Коригираните p са показани спрямо TotiCyte.

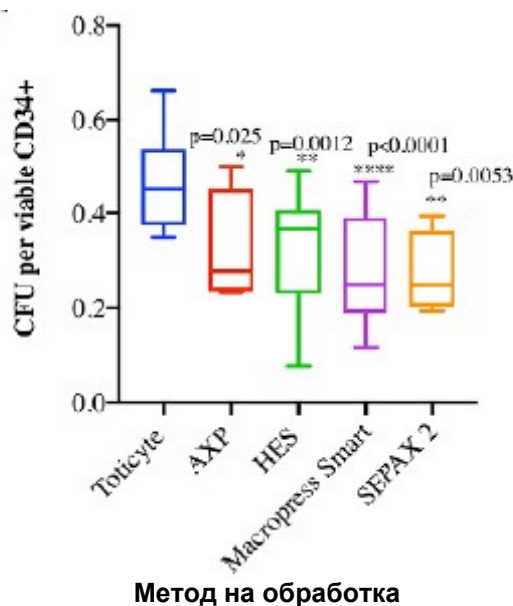
**Сравнение на възстановяването на жизнеспособни CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> клетки след затопляне**

Клетъчното възстановяване след затопляне беше изследвано посредством поточна цитометрия за жизнеспособни CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup> както бе описано по-рано. Бяха проучени сравненията за TotiCyte (n=24), AXP (n=18), HES (n=19), MacoPress Smart (n=11) и Sepax 2 (n=10). Не бяха наблюдавани статистически значими разлики във възстановяването на жизнеспособни CD45<sup>+</sup> клетки след затопляне между TotiCyte (36.28%, CO ± 9.5), HES (31.13%, CO ± 21.7) и MacoPress Smart (32.32%, CO ± 17.8). За отбелязване е, че вариабилността в пробите, обработени посредством ХЕН беше особено набелязана (Фигура 1С). Независимо от това AXP (53.98%, ± CO 17.3 коригирано p=0.025) и Sepax 2 (57.7%, CO ± 9.4 коригирано p=0.0024) показаха по-високо възстановяване на CD45<sup>+</sup> след затопляне в сравнение с другите технологии.

В противовес, изследването на възстановяването на жизнеспособни CD34<sup>+</sup> клетки беше значимо подобро при сравняването на TotiCyte с другите методологии. Средно възстановяване на жизнеспособни клетки след затопляне на обработените с TotiCyte (66.24%, CO ± 9.9), AXP (42.42%, CO ± 17.1, коригирано p=0.0004), ХЕН (41.05%, CO ± 27.4, коригирано p=0.0001), MacoPress Smart (37.92%, CO ± 20.9, коригирано p=0.0003) и Sepax 2 (40.02%, CO ± 14.0, коригирано p=0.0012) проби (Фигура 1D). Това се равнява на 1.6-кратно подобрене във възстановяването на CD34<sup>+</sup> клетките с TotiCyte спрямо AXP и ХЕН и 1.7-кратно спрямо MacoPress Smart и Sepax 2.

### Изследване на формирането на колонии след затопляне

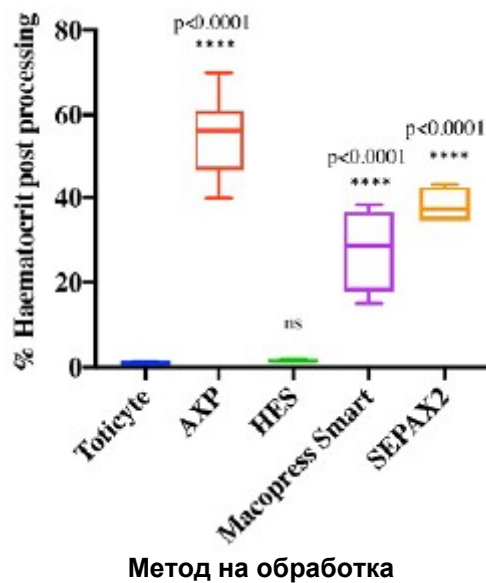
Тъй като жизнеспособността на съхранената чрез замразяване умбиликална кръв не гарантира функционална активност, проведохме изследване за формиращи колонии единици (ФКЕ). За да се предотврати възможно влияние на последващата обработка за премахване на контаминиращите еритроцити от пробите за Sepax 2, MacoPress Smart и AXP, беше използвана поточна цитометрия за повторно определяне на жизнеспособните CD45<sup>+</sup> и жизнеспособните CD34<sup>+</sup> клетки преди пипетирането. Жизнеспособните CD45<sup>+</sup> клетки (2 x 10<sup>4</sup>) бяха пипетирани и броят на жизнеспособни CD34<sup>+</sup> в дадената популация беше изчислен. Това даде абсолютния брой на очакваните колонии, ако се приеме, че 1 ФКЕ възниква от една CD34<sup>+</sup> клетка. Чрез разделяне на абсолютния брой колонии на предвидения брой беше възможно да се изчисли степента на възстановяване. За да премахнем смущаващи фактори във връзка със съотношението само пробите с предвидени ФКЕ > 100 бяха анализирани. TotiCyte беше значимо по-добра в сравнение с всички тествани системи, като произвежда средно ФКЕ/жизнеспособни CD34<sup>+</sup> клетки (0.47, CO ± 0.09) в сравнение с AXP (0.34, CO ± 0.11, коригирано p=0.025), ХЕН (0.32, CO ± 0.12, коригирано p=0.0012), MacoPress Smart (0.28, CO ± 0.11, коригирано p<0.0001) и Sepax 2 (0.27, CO ± 0.09 коригирано p=0.0053) (Фигура 2). Това се равнява на 1.4-кратно повишение в ФКЕ спрямо AXP, 1.5-кратно спрямо ХЕН, 1.7-кратно спрямо MacoPress Smart и Sepax 2.



**Фигура 2:** Изследване на формиращите колонии единици след затопляне. Жизнеспособни CD45+ ( $1.5 \times 10^4$ ), екстрахирани посредством TotiCyte (n=20), AXP (n=7), XEH (n=13), Sepax 2 (n=4) и MacoPress Smart (n=10) бяха култивирани за 14 дни. Показаното формиране на колонии е отнесено към изчисления брой колонии при приемането, че 1 ФКЕ възниква от 1 жизнеспособна CD34+ клетка. Коригираните p са показани спрямо TotiCyte.

### Премахване на еритроцити и хемоглобин

Една от основните ни цели при разработването на TotiCyte беше ефективно отстраняване на контаминиращата еритроцитна популация от ФКЕ без компрометиране на възстановяването на стволови клетки. Измерихме отстраняването посредством стандартно капиларно изследване. TotiCyte отстрани >99% от хематокрита, хематокрит след обработването: TotiCyte (0.9%, CO  $\pm$  0.06); AXP (54.5%, CO  $\pm$  9.2); XEH (1.8%, CO  $\pm$  0.4), MacoPress Smart (27.6%, CO  $\pm$  9.8); Sepax 2 (38.2%, CO  $\pm$  4.4). TotiCyte беше значимо по-добра спрямо Sepax 2, MacoPress Smart и AXP (коригирано  $p < 0.0001$ ), но сходна с XEH, както се очакваше (Фигура 3).



**Фигура 3:** Ниво на хематокрит, изразено в %, което остава след отстраняването на червените кръвни клетки в сравнение с контрола от цяла кръв. TotiCyte (n=10), AXP (n=9), XEH (n=4), Sepax 2 (n=4) MacoPress Smart (n=4). Коригираните p са показани спрямо TotiCyte.

### Обобщение на възстановяването с TotiCyte в сравнение с най-честите системи, използвани при обработване на ФКЕ

Чрез комбиниране на информацията от нашите анализи (Таблица 1) TotiCyte беше в състояние да раздели кръв/CPDA обеми в размер на 30 ml, демонстрира 2.2-кратно подобрене във възстановяването на жизнеспособни CD34<sup>+</sup> клетки в сравнение с AXP, 2.3-кратно повишение спрямо XEH, 3.0-кратно при сравняване с MacoPress Smart и 2.8-кратно повишение спрямо Sepax 2. При това TotiCyte отстрани >99% от контаминиращата еритроцитна популация. Тези наблюдения имат значение за клиниката предвид това, че значителна редукция в еритроцитите вероятно ще премахне несъвместимостта по ABO/Rh, докато същевременно по-добрата жизнеспособност на CD34<sup>+</sup> клетки се очаква да се отрази позитивно посредством повишаване на нивата на приемане.

Метод на обработка	Възстановяване на жизнеспособни CD34 <sup>+</sup> клетки след затопляне	ФКЕ	Сумарни жизнеспособни CD34 <sup>+</sup> клетки след затопляне и ФКЕ спрямо TotiCyte
TotiCyte	1.00	1.00	1.00
AXP	0.64	0.72	0.46
XEH	0.62	0.69	0.43



MacoPress Smart	0.57	0.59	0.34
Sepax 2	0.60	0.58	0.35

Таблица 1: Общо сравняване на TotiCyte с индустриални стандартни технологии за редуция в обема при възстановяването на CD34+ .

## Дискусия

Използвани са много методи за обработка на ФКЕ преди съхранението и при замразяване, предвид това че първата банка за умбиликална кръв е създадена в кръвния център в Ню Йорк, Дюселдорф и Милано през 1992 [12,14-21]. Един от основните проблеми при съхранението на замразена цяла умбиликална кръв е необходимостта от големи помещения за складиране на скъпоструващ течен азот [17]. В резултат, за да се създаде адекватен панел от хемопоеични клетки, единиците умбиликална кръв трябва да бъдат концентрирани в много по-малък обем. По тази причина са разработени технологии за редуция на обема, при които по-голямата част от еритроцитите и плазмата се отстраняват. При всички методи на обработка за редуциране на еритроцитната фракция обаче, има значителна загуба на ядрени клетки и по-важно, на популацията хемопоеични прогениторни клетки, като се цитират загуби между 14-42% в зависимост от използваната технология [14]. Това е от критична важност, тъй като е добре установено, че успехът на трансфузията на умбиликална кръв зависи от клетъчната доза и недостатъчна доза клетки широко се приема за най-важния ограничаващ фактор при трансплантацията на умбиликална кръв, особено при възрастни и големи деца [4,5,7,8,10,12 24-27]. Към момента този факт е допълнително влошен от въвеждането на забавеното клампирание на пъпната връв, което още повече намалява обема на добитата умбиликална кръв.

Опитахме се да разработим нова методология за обработка, за да се отстрани еритроцитната фракция и да се позволи обогатяване на общата популация от ядрени клетки. За тази цел разработихме реагента TotiCyte. TotiCyte предизвиква бързо формиране на еритроцитни стълбчета за по-малко от 30 минути без значима загуба в популацията на белите клетки. Получения обем умбиликална кръв след обработката с TotiCyte е в общи линии сходен с обемите, получени при алтернативни методи на обработка (около 23 ml), но остатъчният хематокрит е по-малко от 1% в противовес на >40% за AXP, Sepax 2 и MacoPress Smart. При нашето провеждане ХЕН се представи сходно, макар че съществува несъответствие в литературата по отношение на нивото на еритроцитна контаминация при използването на тази методология. Още по-важно, с TotiCyte беше наблюдавано драматично подобрене във възстановяването на CD34<sup>+</sup> клетки след затопляне спрямо другите тествани системи с над общо 66% възстановяване. В допълнение, възстановяванията бяха по-малко вариабилни специално в сравнение с ХЕН и AXP. Една важна особеност на нашето изследване е, че докладваме процент възстановяване след обработка и след затопляне спрямо необработената цяла кръв в началото. Това позволява да се докладват абсолютните загуби на всеки етап, за разлика от други изследвания, които докладват след затопляне към след обработка и по този начин изкуствено повишават докладваните възстановявания.

Ясно е, че TotiCyte подобрява тоталното възстановяване на ядрени клетки след затопляне. Независимо от това, съществува предположение, че мярката на общата доза ядрени клетки като мярка за ефикасност на обработващия метод може да е подвеждаща [28] и че трябва да се прилага "коригиращ фактор" от 0.75 към докладвания общ брой ядрени клетки в банки с еритроцити, тъй като те ще съдържат некритични ядрени червени клетки и неутрофили и следователно вероятността за успех при придвижването им към костния мозък е надценена, поради високото съдържание на нуклеарни еритроцити, което от своя страна би могло да наведе на допускането за по-високо съдържание на хемопоеични стволови клетки. Това пък е оборено с довода, че ако е невярно, би могло да доведе до подценяване на съдържанието на прогениторни клетки, което да резултира в неправилното отхвърляне от трансплантационни центрове на подходящи кръвни единици [29].

Алтернативна мярка за определяне на потенциала на единиците умбиликална кръв за достигане до костния мозък е изследването на формиращите колонии единици (ФКЕ). Демонстрирано е, че дозата на ФКЕ след затоплянето е силен предиктор за успех на придвижването до костния мозък [23]. Подобно на това, нашето проучване показва, че жизнеността след затопляне не корелира директно с потенциална ФКЕ. Това допълнително подкрепя нуждата от анализа на ФКЕ след затопляне като важно условие за валидация на

методите за обработка и за текуща валидация на платформите за валидация, използвани от кръвните банки.

### **Заклучение**

Ние открихме, че TotiCyte драматично подобрява жизнеспособното възстановяване на хемопоеични стволови клетки в сравнение със стандартни производствени методи. TotiCyte е изгоден, позволява съхранение на намалени обеми, а същевременно отстранява >99% от еритроцитното съдържание при малки загуби от фракцията на белите клетки. Важността на подобреното възстановяване след затопляне не може да бъде прекомерно акцентирана и би могла да доведе до трансплантации с драматично подобрен резултат. В допълнение, резултатите от изследването на ФКЕ ясно показва, че трябва да се превърне в стандарт за валидация на методологии за обработка на умбиликална кръв. Нашите данни ясно демонстрират, че обработката на УК с TotiCyte предоставя значително по-ефективен метод за събиране на ценни популации от прогениторни клетки.

### **Признателност**

Авторите биха желали да благодарят на д-р Хавиер Фонтана и д-р Тим Шевасо за техническата подкрепа и насоки.

### **Принос на авторите**

Концепция на изследването: JD, Експериментален дизайн и провеждане: JD, LAM, RS, WH, MW, Анализ на данните: AK, LAM, JD, WC. Подготовка на текста: LAM, JD, Преглед на текста: WC, CR, JD, LAM, AK.

### **Конфликт на интереси**

Това изследване беше изцяло финансирано от CyteTech ООД. Всички автори са или са били служители на CyteTech.

### **Литература**

1. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, et al. (2004) Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 351: 2276-2285.
2. Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, et al. (2009) Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood* 113: 1631-1638.
3. Eapen M, Wagner JE (2010) Transplant outcomes in acute leukemia. *J Semin Hematol* 47: 46-50.
4. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, et al. (2002) Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and non-malignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100: 1611-1618.
5. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE (2010) Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood* 115: 1843-1849.
6. Cutler C, Multani P, Robbins D, Kim HT, Le T, et al. (2013) Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 122: 3074-3081.
7. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blaza BR, McGlave PB, et al. (2005) Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105: 1343-1347.
8. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, et al. (2007) Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 82-89.
9. Wagner JE, Eapen M, Carter S, Wang Y, Schultz KR, et al. (2014) Oneunit versus two-unit cord-blood transplantation for hematologic cancers. *N Engl J Med* 371: 1685-1694.
10. Fernandez MN, Regidor C, Cabrera R, García-Marco JA, Forés R, et al. (2003) Unrelated umbilical-cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol* 31: 535-544.
11. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, et al. (2003) Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced intensity conditioning. *Blood* 102: 1915-1919.
12. Chow R, Nademanee A, Rosenthal J, Karanes C, Jaing TH, et al. (2007) Analysis of hematopoietic cell transplants using plasma-depleted cord blood products that are not red blood cell reduced. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 1346-1357.
13. Barker JN, Abboud M, Rice RD, Hawke R, Schaible A, et al. (2009) A "nowash" albumin-dextran dilution strategy for cord blood unit thaw: High rate of engraftment and a low incidence of serious infusion reactions. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1596-1602.
14. Takahashi TA, Rebullá P, Armitage S, van Beckhoven J, Eichler H, et al. (2006) Multi-laboratory evaluation of procedures for reducing the volume of cord blood: influence on cell recoveries. *Cytotherapy* 8: 254-264.
15. Denning-Kendall P, Donaldson C, Nicol A, Bradley B, Hows J (1996) Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking. *Exp Hematol* 24: 1394-1401.
16. Regidor C, Posada M, Monteagudo D, Garaulet C, Somolinos N, et al. (1999) Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: evaluation of cell separation and storage methods. *Exp Hematol* 27: 380-385.
17. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Miglicaccio G, et al. (1995) Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10119-10122.
18. Lasky LC, Lane TA, Miller JP, Lindgren B, Patterson HA, et al. (2002) In utero or ex utero cord blood collection: Which is better? *Transfusion* 42: 1261-1267.

19. Alonso JM 3rd, Regan DM, Johnson CE, Oliver DA, Fegan R, et al. (2001) A simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St. Louis and Ohio cord blood bank experiences. *Cytotherapy* 3: 429-433.
20. Lapiere V, Pellegrini N, Bardey I, Malugani C, Saas P, et al. (2007) Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy* 9: 165-169.
21. Dazey B, Duchez P, Letellier C, Vezon G, Ivanovic Z, et al. (2005) Cord blood processing by using a standard manual technique and automated closed system "Sepax" (Kit CS-530). *Stem Cells Dev* 14: 6-10.
22. Tanaka M, Yanagisawa R, Yamanaka M, Konno S, Takemura K, et al. (2020) Transfusion outcome for volume- and plasma-reduced platelet concentrates for pediatric patients. *Transfus Apher Sci* 59: 102776.
23. Morgenstern DA, Ahsan G, Brocklesby M, Ings S, Balsa C, et al. (2016) Post-thaw viability of cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) does not Guarantee functional activity: important implications for quality assurance of stem cell transplant programmes. *Br J Haematol* 174: 942-951.
24. Jaing TH, Yang CP, Hung IJ, Chen SH, Sun CF, et al. (2007) Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood utilizing double-unit grafts for five teenagers with transfusion-dependent thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 40: 307-311.
25. Barker JN, Kempenich J, Kurtzberg J, Brunstein CG, Delaney C, et al. (2019) CD34+ cell content of 126 341 cord blood units in the US inventory: implications for transplantation and banking. *Blood Adv* 3: 1267-1271.
26. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, et al. (2007) Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369: 1947-1954.
27. Ruggeri A, Eapen M, Scaravadou A, Cairo MS, Bhatia M, et al. (2011) Umbilical cord blood transplantation for children with thalassemia and sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 17: 1375-1382.
28. Barker JN, Byam C, Scaravadou A (2011) How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood* 117: 2332-2339.
29. Petz LD, Chow R (2011) Selection of unrelated cord blood grafts. *Blood* 118: 478- 479.



Advances In Industrial Biotechnology | ISSN: 2639-5665  
 Advances In Microbiology Research | ISSN: 2689-694X  
 Archives Of Surgery And Surgical Education | ISSN: 2689-3126  
 Archives Of Urology  
 Archives Of Zoological Studies | ISSN: 2640-7779  
 Current Trends Medical And Biological Engineering  
 International Journal Of Case Reports And Therapeutic Studies | ISSN: 2689-310X  
 Journal Of Addiction & Addictive Disorders | ISSN: 2578-7276  
 Journal Of Agronomy & Agricultural Science | ISSN: 2689-8292  
 Journal Of AIDS Clinical Research & STDs | ISSN: 2572-7370  
 Journal Of Alcoholism Drug Abuse & Substance Dependence | ISSN: 2572-9594  
 Journal Of Allergy Disorders & Therapy | ISSN: 2470-749X  
 Journal Of Alternative Complementary & Integrative Medicine | ISSN: 2470-7562  
 Journal Of Alzheimers & Neurodegenerative Diseases | ISSN: 2572-9608  
 Journal Of Anesthesia & Clinical Care | ISSN: 2378-8879  
 Journal Of Angiology & Vascular Surgery | ISSN: 2572-7397  
 Journal Of Animal Research & Veterinary Science | ISSN: 2639-3751  
 Journal Of Aquaculture & Fisheries | ISSN: 2576-5523  
 Journal Of Atmospheric & Earth Sciences | ISSN: 2689-8780  
 Journal Of Biotech Research & Biochemistry  
 Journal Of Brain & Neuroscience Research  
 Journal Of Cancer Biology & Treatment | ISSN: 2470-7546  
 Journal Of Cardiology Study & Research | ISSN: 2640-768X  
 Journal Of Cell Biology & Cell Metabolism | ISSN: 2381-1943  
 Journal Of Clinical Dermatology & Therapy | ISSN: 2378-8771  
 Journal Of Clinical Immunology & Immunotherapy | ISSN: 2378-8844  
 Journal Of Clinical Studies & Medical Case Reports | ISSN: 2378-8801  
 Journal Of Community Medicine & Public Health Care | ISSN: 2381-1978  
 Journal Of Cytology & Tissue Biology | ISSN: 2378-9107  
 Journal Of Dairy Research & Technology | ISSN: 2688-9315  
 Journal Of Dentistry Oral Health & Cosmesis | ISSN: 2473-6783  
 Journal Of Diabetes & Metabolic Disorders | ISSN: 2381-201X  
 Journal Of Emergency Medicine Trauma & Surgical Care | ISSN: 2378-8798  
 Journal Of Environmental Science Current Research | ISSN: 2643-5020  
 Journal Of Food Science & Nutrition | ISSN: 2470-1076  
 Journal Of Forensic Legal & Investigative Sciences | ISSN: 2473-733X  
 Journal Of Gastroenterology & Hepatology Research | ISSN: 2574-2566  
 Journal Of Genetics & Genomic Sciences | ISSN: 2574-2485  
 Journal Of Gerontology & Geriatric Medicine | ISSN: 2381-8662  
 Journal Of Hematology Blood Transfusion & Disorders | ISSN: 2572-2999  
 Journal Of Hospice & Palliative Medical Care  
 Journal Of Human Endocrinology | ISSN: 2572-9640  
 Journal Of Infectious & Non Infectious Diseases | ISSN: 2381-8654  
 Journal Of Internal Medicine & Primary Healthcare | ISSN: 2574-2493  
 Journal Of Light & Laser Current Trends  
 Journal Of Medicine Study & Research | ISSN: 2639-5657  
 Journal Of Modern Chemical Sciences  
 Journal Of Nanotechnology Nanomedicine & Nanobiotechnology | ISSN: 2381-2044

Journal Of Neonatology & Clinical Pediatrics | ISSN: 2378-878X  
Journal Of Nephrology & Renal Therapy | ISSN: 2473-7313  
Journal Of Non Invasive Vascular Investigation | ISSN: 2572-7400  
Journal Of Nuclear Medicine Radiology & Radiation Therapy | ISSN: 2572-7419  
Journal Of Obesity & Weight Loss | ISSN: 2473-7372  
Journal Of Ophthalmology & Clinical Research | ISSN: 2378-8887  
Journal Of Orthopedic Research & Physiotherapy | ISSN: 2381-2052  
Journal Of Otolaryngology Head & Neck Surgery | ISSN: 2573-010X  
Journal Of Pathology Clinical & Medical Research  
Journal Of Pharmacology Pharmaceutics & Pharmacovigilance | ISSN: 2639-5649  
Journal Of Physical Medicine Rehabilitation & Disabilities | ISSN: 2381-8670  
Journal Of Plant Science Current Research | ISSN: 2639-3743  
Journal Of Practical & Professional Nursing | ISSN: 2639-5681  
Journal Of Protein Research & Bioinformatics  
Journal Of Psychiatry Depression & Anxiety | ISSN: 2573-0150  
Journal Of Pulmonary Medicine & Respiratory Research | ISSN: 2573-0177  
Journal Of Reproductive Medicine Gynaecology & Obstetrics | ISSN: 2574-2574  
Journal Of Stem Cells Research Development & Therapy | ISSN: 2381-2060  
Journal Of Surgery Current Trends & Innovations | ISSN: 2578-7284  
Journal Of Toxicology Current Research | ISSN: 2639-3735  
Journal Of Translational Science And Research  
Journal Of Vaccines Research & Vaccination | ISSN: 2573-0193  
Journal Of Virology & Antivirals  
Sports Medicine And Injury Care Journal | ISSN: 2689-8829  
Trends In Anatomy & Physiology | ISSN: 2640-7752