

Presso l'Unità Operativa di Ematologia e CTMO dell'Ospedale di Cremona mi sto occupando del progetto "Studio delle cellule staminali /progenitrici CD34+ dopo criopreservazione" grazie al finanziamento di una borsa di studio da parte dell'Associazione Beat Leukemia.

In questi mesi mi sono occupata della raccolta e organizzazione in un database elettronico di dati demografici, clinici e di terapia, retrospettivi e prospettici, di pazienti affetti da varie patologie oncoematologiche. La casistica di pazienti scelti per lo studio, su cui è stata posta l'attenzione, riguarda pazienti sottoposti a regimi di mobilizzazione di cellule staminali emopoietiche (CSE) nel sangue periferico in prospettiva di un trapianto autologo. Le cellule staminali emopoietiche si caratterizzano per l'espressione dell'antigene di superficie CD34.

In totale ho raccolto dati riguardanti 75 pazienti, di cui 32 con Mieloma Multiplo, 35 con Linfoma non-Hodgkin (di cui uno evoluto da LLC, Sindrome di Richter), 3 con Linfoma di Hodgkin e 5 con altre patologie (4 Leucemie Mieloidi Acute e 1 Leucemia Linfoblastica Acuta). Cinque dei 75 pazienti sono stati sottoposti a due regimi di mobilizzazione in tempi diversi; di conseguenza prendiamo in considerazione dati di 80 mobilizzazioni.

Di questi 75 pazienti, 59 sono andati incontro a trapianto autologo di CSE.

Nella tabella sottostante è riportata la casistica analizzata suddivisa per patologia e sesso.

	MM	LNH	LH	Altro	Totale
M	17	25	2	4	48
F	15	10	1	1	27
Totale	32	35	3	5	75

Delle 80 mobilizzazioni, 73 hanno portato con successo alla raccolta di CSE effettuando da un minimo di una ad un massimo di tre staminoafesi in giorni consecutivi.

Poiché il prodotto autologo, per i tempi richiesti dai protocolli di condizionamento, è quasi sempre criocongelato, per 92 staminoafesi ho raccolto i dati riguardanti il numero di cellule CD34⁺/μl di sangue presente nella sacca aferetica dopo scongelamento e la loro vitalità. A tal fine sono stati utilizzati due metodi: il metodo di conta al citofluorimetro universalmente riconosciuto, definito ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) [Sutherland DR et al, 1996], e una sua variante, sviluppata presso la nostra Istituzione in collaborazione con il centro di Firenze (denominata ISHAGE-MOD).

L'obiettivo principale dello studio è quello di ottimizzare la valutazione quali-quantitativa delle cellule staminali/progenitrici CD34⁺ presenti nei campioni aferetici dopo scongelamento in pazienti affetti da malattie oncoematologiche sottoposti a terapia di mobilizzazione.

L'esigenza di identificare una procedura citofluorimetrica standard ottimale nasce dall'evidenza che mentre sul campione di sangue aferetico fresco l'analisi citofluorimetrica dimostra una forte correlazione positiva tra il numero delle cellule CD34⁺ e il successo di attecchimento piastrinico e granulocitario; nel prodotto scongelato questa stretta correlazione viene persa a causa della morte di una quota di cellule staminali per effetto del processo di congelamento.

Entrambi i metodi citofluorimetrici qui adottati si basano sull'utilizzo di un pannello di anticorpi monoclonali e di un colorante vitale, così definito: anticorpi contro l'antigene pan-leucocitario CD45; anticorpi contro l'antigene CD34, la molecola espressa sulla superficie dei precursori emopoietici immaturi e la 7-AAD (7-amino actinoamicina), un colorante che penetra nelle cellule morte le quali risultano quindi positive per questo marcatore; oltre che a due parametri fisici che valutano la morfologia e la dimensione cellulare e sono rispettivamente SSC (side-scattered) e FSC (forward-scattered).

Ciò che differenzia il metodo standard ISHAGE da quello proposto ISHAGE-MOD è la strategia di "gating", ovvero la selezione mediante l'apposito software di una finestra/regione che permette di isolare una determinata popolazione da tutte le altre sulla base della marcatura considerata, e di analizzare i parametri successivi del pannello di interesse solo all'interno della popolazione appunto selezionata, dividendola così in ulteriori sottopopolazioni.

La strategia adottata si basa sull'intersezione delle cellule che per dimensione sono comprese tra i linfociti e i monociti, che sono positive per il CD34, che possiedono una diminuita espressione del CD45 (CD45 DIM) e che sono negative per il colorante 7-AAD. Ciò che differenzia i due metodi è l'esclusione o meno dei detriti cellulari, definiti "debris", durante l'acquisizione del campione (vedi figura1 pannello A e figura 2 pannello A). I detriti cellulari cadono vicino all'intersezione degli assi nell'analisi SSC verso FSC, in quanto sono piccoli per dimensione e con una complessità cellulare bassa; tra questi cadono anche cellule morte. Nell'ISHAGE standard questi detriti vengono eliminati mentre nell'ISHAGE modificato vengono portati avanti nell'analisi. Questa modifica è stata pensata per il fatto che il processo di congelamento determina una riduzione in dimensione e morfologia strutturale di tutte le cellule, determinando la possibilità che alcune cellule staminali possano cadere nella zona dei "debris", e di conseguenza essere erroneamente escluse dalla conta cellulare seguendo il metodo ISHAGE standard.

Sotto sono riportati due esempi di analisi citofluorimetrica dello stesso campione utilizzando i due metodi.

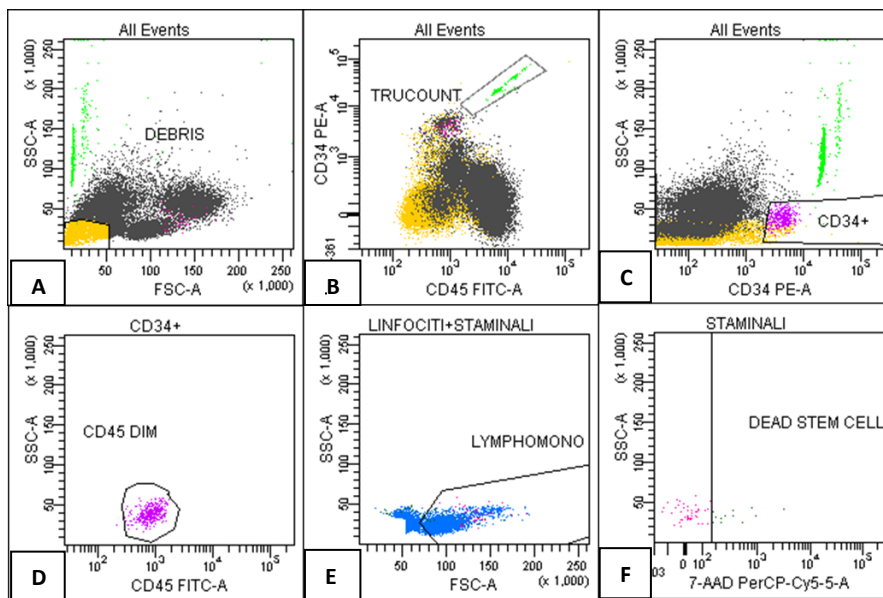


Fig. 1

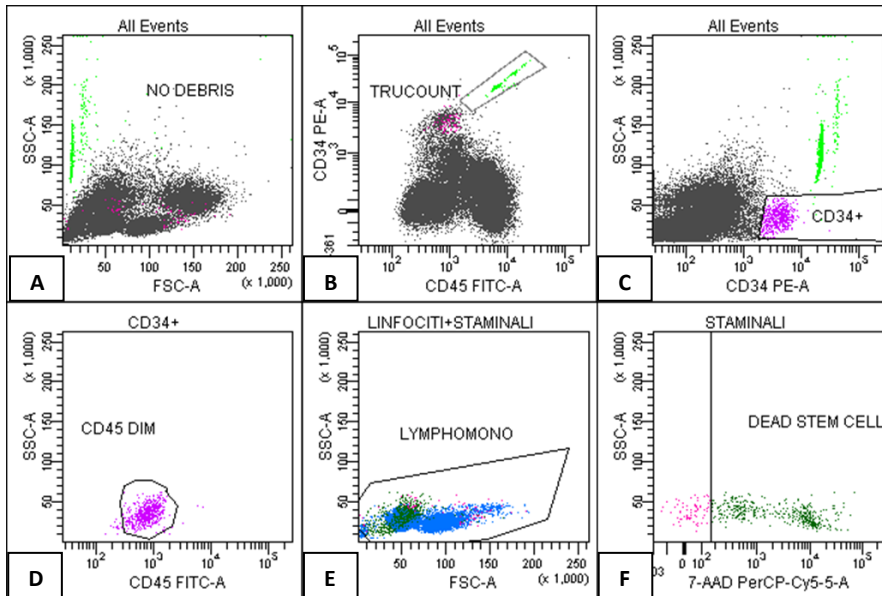


Fig. 2

Nella figura 1 è riportata l'analisi effettuata con il metodo ISHAGE e la conta delle cellule CD34⁺ è pari a un numero di 260 per μl di sangue raccolto durante l'aferesi, con una vitalità del 72%. Mentre nella figura 2 è riportata l'analisi effettuata con il metodo ISHAGE-MOD e i risultati ottenuti di conta e vitalità sono pari a 2316 CD34⁺/ μl e a 15%.

Dai valori riportati nei due esempi si può notare come nell'ISHAGE-MOD aumenta il numero della conta cellulare, per il fatto che vengono considerate le cellule di tutte le dimensioni e complessità strutturale, anche quelle morte, a discapito della vitalità che risulta drasticamente diminuita. Come si può vedere infatti nel pannello F della figura 2 rispetto al pannello F della figura 1 le cellule conteggiate in più con il metodo modificato cadono per lo più nell'area 7-AAD positiva, cioè quella delle cellule morte.

Entrando nel dettaglio dei dati raccolti presso l'UO di Ematologia di Cremona, ho effettuato un'analisi statistica utilizzando il t-test, a due code, accoppiato, per valutare se esiste o meno una differenza statisticamente significativa tra il metodo ISHAGE e ISHAGE-MOD nel determinare la conta delle cellule CD34⁺ e nel determinare la loro vitalità. In entrambe le analisi è risultato un p significativo pari a $p=2.79 \cdot 10^{-10}$ valutando la conta CD34⁺/ μl (Figura 3), e $p=4.70 \cdot 10^{-35}$ valutando la vitalità cellulare (Figura 4).

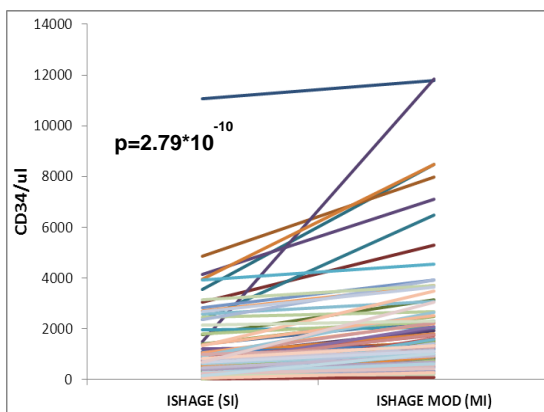


Fig. 3

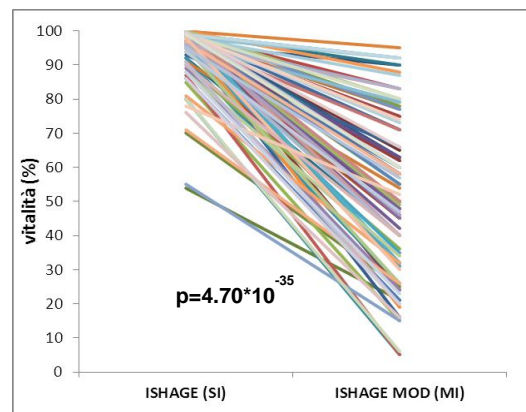


Fig. 4

I risultati ottenuti permettono di affermare che il metodo utilizzato influisce sui valori di CD34⁺/ μl e di vitalità delle CD34⁺ contate.

Negli ultimi anni sono usciti numerosi lavori scientifici che hanno concentrato la loro attenzione sul definire quale sia la quota di CD34⁺ ottimale da reinfondere nel paziente sottoposto a trapianto autologo affinché vada incontro ad attecchimento granulocitario e piastrinico in tempi buoni. Attualmente la dose ottimale di cellule CD34⁺ da reinfondere che si è vista portare a un trapianto di successo è compresa tra 2 e 4x10⁶ CD34⁺/kg [Russell N et al, 2013; DiPersio JF et al, 2009]. Universalmente si intende raggiunto l'attecchimento granulocitario il primo giorno in cui il valore dei granulociti neutrofilici risulta $\geq 0.5 \times 10^9/L$ per tre giorni consecutivi, mentre l'attecchimento piastrinico il primo giorno di tre giorni consecutivi in cui la conta delle piastrine risulta $\geq 20 \times 10^9/L$.

Per arrivare a questi valori di riferimento esistono recenti lavori scientifici [Lanza F et al, 2013; Lanza F et al, 2014; D'Rozario J et al, 2014; Gertz MA et al, 2014] che indagano sul rapporto tra il valore delle cellule CD34⁺x10⁹/L infuse durante la procedura di trapianto autologo e l'outcome clinico inteso come giorni impiegati per raggiungere l'attecchimento granulocitario e piastrinico.

Abbiamo proceduto nel valutare questo aspetto anche nel nostro set di dati.

Nel nostro centro la quota minima di cellule CD34⁺ che per pratica clinica si è stabilito di raccogliere e reinfondere per poter affrontare un trapianto autologo è pari a 3x10⁶/kg.

Durante il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche per arrivare a questa quota soglia di CSE, possono essere reinfuse da una a più sacche aferetiche precedentemente congelate. Poiché come già discusso precedentemente, il processo di congelamento causa la morte di una frazione di cellule, tra cui anche le cellule CD34⁺, abbiamo calcolato il numero totale di cellule staminali pro kg reinfuso aggiustato per la vitalità, in modo da correlare con i giorni di attecchimento granulocitario e piastrinico il vero valore di cellule staminali emopoietiche reinfuse vitali. Il calcolo è stato eseguito considerando i valori di vitalità sia seguendo la metodica ISHAGE sia quella ISHAGE-MOD. Questa analisi è stata condotta su un totale di 17 pazienti trapiantati per i quali era disponibile il dato sulla vitalità delle cellule CD34⁺ specifico per ogni singola sacca reinfusa utilizzando entrambi i metodi citofluorimetrici ISHAGE e ISHAGE-MOD.

Nella tabella sottostante sono riportati i valori medi con deviazione standard e i valori mediani con minimo e massimo per il numero di CD34⁺ reinfuse, i giorni di attecchimento piastrinico e granulocitario nel sottoinsieme dei 17 pazienti considerati.

	<i>ISHAGE</i>	<i>ISHAGE-MOD</i>	Giorni di attecchimento granulocitario	Giorni di attecchimento piastrinico
<i>Media (± Dev. St.)</i>	6.22 (±2,29)	3.43 (±1.18)	18.06 (±9.24)	32.88 (±24.09)
<i>Mediana (Min-Max)</i>	5.70 (3.17-3.27)	3.06 (1.94-6.12)	13.00 (9.00-40.00)	27.00 (12.00-95.00)

Sotto sono riportati i grafici di regressione lineare con i valori di correlazione tra le variabili discusse. Non è stata rilevata alcuna correlazione significativa, anche se osservando le figure 7 e 8, cioè la correlazione tra numero di CD34⁺ vitali (secondo metodo ISHAGE-MOD) reinfuse e giorni di attecchimento rispettivamente granulocitario e piastrinico si osserva la tendenza che all'aumentare del numero di cellule CD34⁺ diminuiscono i giorni di attecchimento granulocitario e piastrinico.

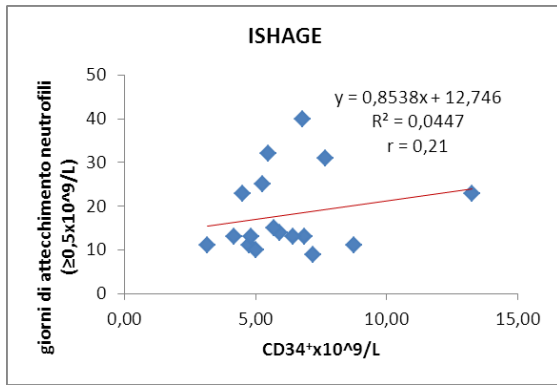


Fig. 5

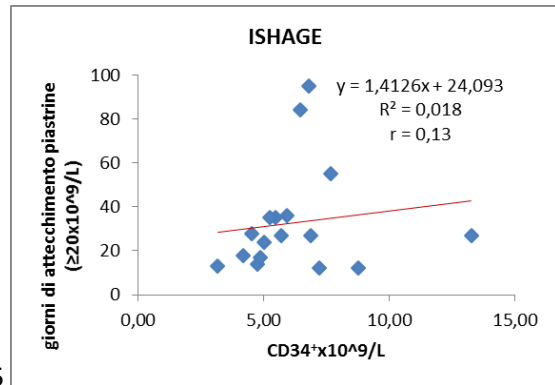


Fig. 6

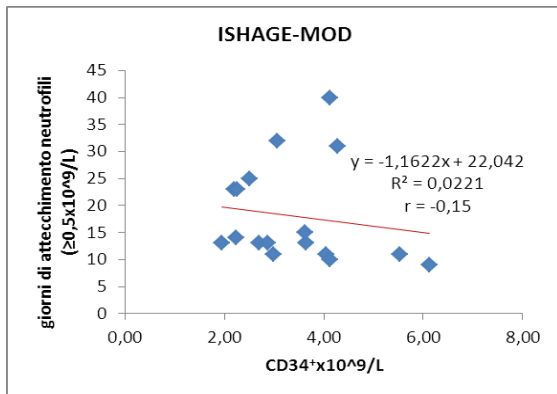


Fig. 7

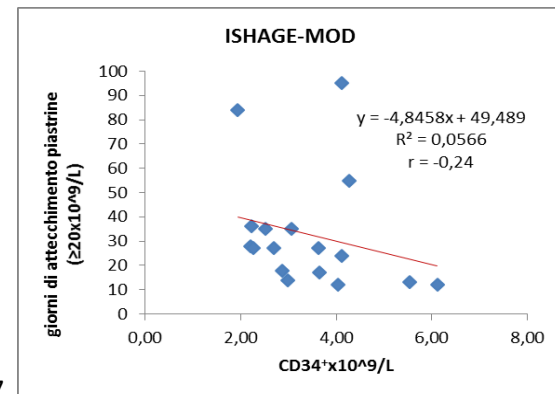


Fig. 8

Poiché dai grafici è visibile la presenza di tre campioni outliers, cioè che si discostano significativamente dalla linea rossa di tendenza, per i dati secondo metodo ISHAGE-MOD, ho rifatto le analisi di correlazione eliminando questi campioni. I valori di correlazione così ottenuti sono $r = -0,55$ relativamente all'attecchimento granulocitario (Figura 9) e $r = -0,69$ relativamente all'attecchimento piastrinico (Figura 10); dimostrando la presenza di una correlazione significativa tra le variabili.

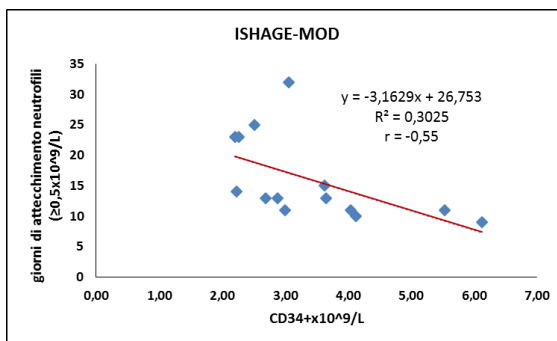


Fig. 9

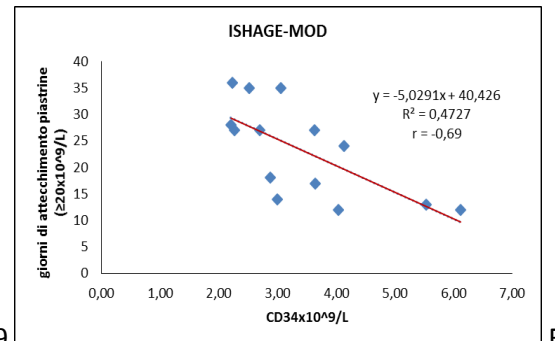


Fig.10

Andando ad analizzare la globalità della storia clinica di questi tre pazienti outliers siamo stati in grado di attribuire il ritardo nei tempi di attecchimento rispetto alla media degli altri campioni a fattori quali infezioni da batteri che hanno determinato sepsi e riattivazioni virali nel paziente durante la fase di neutropenia conseguente ai regimi di condizionamento effettuati per il programma trapiantologico.

Le caratteristiche che rendono una raccolta di cellule staminali emopoietiche "ideale" possono essere riconosciute tra aspetti di tipo economico/organizzativo, quali il minor numero di procedure aferetiche da effettuare per raccogliere il quantitativo necessario di cellule CD34⁺ ai fini dell'autotrapianto e il minor numero di giorni di ospedalizzazione per il monitoraggio post aferesi del paziente; e aspetti di tipo qualitativo inerenti la sacca aferetica stessa, come una bassa contaminazione di polimorfo nucleati e un'assente contaminazione di cellule tumorali.

Prendendo spunto da quanto detto sopra relativamente alla contaminazione della sacca aferetica da parte dei polimorfo nucleati ho raccolto i dati relativi alla contaminazione da parte dei globuli bianchi (WBC) presenti in 68 sacche aferetiche di cellule CD34⁺ dei pazienti sopra descritti sottoposti a procedura di trapianto autologo. Non è stato possibile raccogliere il dato relativo alla sola sottopopolazione dei granulociti neutrofili in quanto dato mancante per questo è stato deciso di raccogliere il dato disponibile dell'intera popolazione di globuli bianchi comprensiva comunque dei granulociti neutrofili. Lo scopo era quello di valutare se una crescente contaminazione da parte della popolazione leucocitaria della sacca aferetica possa influire sulla vitalità delle cellule CD34⁺ in essa contenute. Il valore medio di WBC ottenuto su 68 sacche considerate è pari a $110.96 \times 10^9/L$ (dev.st.: $\pm 48.37 \times 10^9/L$), mentre il valore mediano è pari a $112.18 \times 10^9/L$ (range: $7.14 \times 10^9/L - 259.86 \times 10^9/L$).

Il valore della conta di globuli bianchi è stato poi correlato con il valore di vitalità delle cellule CD34⁺ ottenuto mediante le due metodiche citofluorimetriche ISHAGE (Figura 11) e ISHAGE-MOD (Figura 12).

Come mostrato dai grafici sotto riportati e dai relativi valori di correlazione, nel set dei dati da noi raccolti non è stata evidenziata alcuna correlazione tra le due variabili.

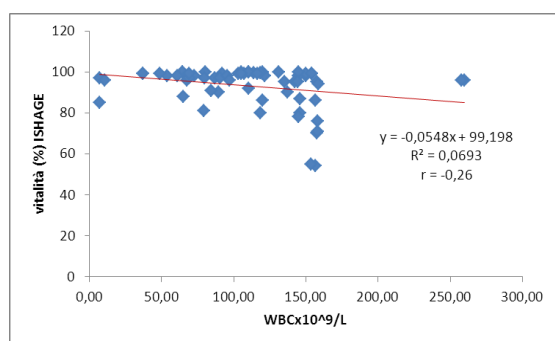


Fig. 11

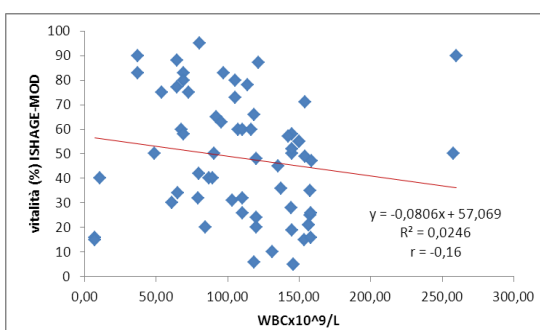


Fig. 12

Tutte le analisi fin ora descritte riguardano solo alcune delle numerose variabili che in un processo delicato e complesso come la procedura di mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche, la loro raccolta e successivo trapianto autologo, vede implicate.

La riuscita di queste procedure può ad esempio essere influenzata dalla storia terapeutica precedente dei pazienti interessati; è ormai scientificamente dimostrato e riportato in letteratura [Olivieri A et al, 2011; Wuchter P et al, 2010] che alcuni regimi di chemioterapia inficiano il successo della procedura di mobilizzazione. Inoltre anche l'andamento clinico del paziente durante il programma trapiantologico influenza la buona riuscita della procedura e i tempi di attecchimento granulocitario e piastrinico, come la comparsa di infezioni batteriche o la riattivazione di virus quali CMV e EBV.

Quello che si prevede di fare è proseguire sia nello sforzo di recupero dei dati clinici retrospettivi per poter effettuare analisi statistiche più approfondite che tengano in considerazione più variabili contemporaneamente, sia proseguire nella raccolta dei dati relativi a nuovi trapianti in modo da incrementare la dimensione del campione analizzato così da aumentare la potenza statistica.

Bibliografia

- Sutherland DR, et al. "The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering." J Hematother. 1996; 5 (3):213-26.
- Russell N, et al. "Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective PREDICT trial." Haematologica. 2013; 98(2).
- DiPersio JF, et al. "Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma." Blood. 2009; 113:5720-5726.

- Lanza F, et al. "Individual quality assessment of autografting by probability estimation for clinical endpoints: a prospective validation study from the European group for blood and marrow transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Dec; 19(12):1670-6.
- Lanza F, et al. "Quality assessment of autologous haematopoietic blood progenitor cell grafting." *Ann Hematol* 2014.
- D'Rozario J, et al. "Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation." *Transfusion and Apheresis Science*. 2014 50:443-150.
- Gertz MA, et al. "How we manage autologous stem cell transplantation for patients with multiple myeloma." *Blood*. 2014 Aug 7; 124(6):882-90.
- Olivieri A, et al. "Proposed definition of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo." *Bone Marrow Transplant*. 2012 Mar; 47(3):342-51.
- Wuchter P, et al. "Poor mobilization of hematopoietic stem cells-definitions, incidence, risk factors, and impact on outcome of autologous transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Apr 16(4):490-9.