

Extracorporeal photopheresis (ECP): in vitro assessment of procedure quality

Fotoferesi extracorporea (ECP): valutazione in vitro della qualità della procedura

Authors

Sara Cavallar¹, Elia Ranzato¹, Thea Bensi², Giuseppina Balza³, Lia Mele³

¹ Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica (DiSIT), Università del Piemonte Orientale, Alessandria, Italy

² SC Laboratorio Analisi-laboratorio di Citofluorimetria, AO "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria, Italy.

³ SC Medicina Trasfusionale-laboratorio di Processazione CSE, AO "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria, Italy.

Original article

Key words: ECP, Extracorporeal photopheresis, Quality control, GvHD, Flow cytometry, Annexin V/ 7ADD

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this work was to validate the procedure of extracorporeal photopheresis (ECP) offline after the addition of 8-MOP and UV-A (PUVA) irradiation by carrying out functional tests as recommended by the GITMO/SIdEM guidelines. There is currently no general agreement on the protocol to be adopted for the biological validation of the ECP; in fact, it is required that the test needs to be reproducible, reliable and standardisable. So, the protocol need to be replicated in every processing laboratory.

Methods: in absence of guidelines and evidence to support ECP, we have chosen to monitor cellular apoptosis induced by 8-MPO and UV-A (PUVA) irradiation, after 1 h, 48 h, and 96 h, using double marking with FITC-Annexine V and 7-AAD and consequent cytofluorimetric evaluation.

Results: the functional tests utilized reproduce in vitro the 8-MOP activation effects.

Our data suggest that the use of double staining with FITC-Annexine V and 7-AAD and subsequent cytofluorimetric evaluation may represent a reliable and reproducible method for ECP biological validation.

Conclusions: the work allowed us to review our ECP validation procedure. We will adopt as functional test the double marking FITC-Annex V and 7-AAD and reading in cytofluorimetry at +48h post PUVA. The test need to be performed on each enlisted patient, during the first two procedures, with each modification of the set used and at each 8-MOP batch change.

We do not know what is the impact of the ECP procedure in terms of clinical efficacy or if reinfused cells are biologically inactivated or not active in the patient with GvHD. Clinical follow-up must remain the key parameter for evaluating the response to ECP treatment because even qualified therapy becomes clinically irrelevant in a patient not responding to treatment.

ABSTRACT

Obiettivi: scopo del presente lavoro è stato quello validare la procedura di fotoferesi extracorporea (ECP) offline dopo aggiunta di 8-MOP e irradiazione con UV-A (PUVA) effettuando test funzionali come raccomandato dalle linee guida GITMO/SIdEM. Attualmente non c'è un accordo generale sul protocollo da adottare per la validazione biologica dell'ECP; si richiede infatti che il test sia riproducibile, affidabile e standardizzabile così che possa essere replicato in ogni laboratorio di processazione.

Metodi: in assenza di direttive ed evidenze a supporto dell'ECP, abbiamo scelto di monitorare l'apoptosi cellulare indotta da 8-MPO e irradiazione con UV-A (PUVA), a 1 h, 48 h, 96 h, utilizzando la doppia marcatura con FITC-Annessina V e 7-AAD e conseguente lettura citofluorimetrica.

Risultati: i test funzionali che abbiamo utilizzato in questo studio riproducono in vitro gli effetti dovuti all'attivazione dell'8-MOP. I nostri dati suggeriscono che l'utilizzo della doppia colorazione con FITC-Annessina V e 7-AAD e conseguente lettura citofluorimetrica possa rappresentare un metodo affidabile e riproducibile da utilizzare per la validazione biologica dell'ECP.

Conclusioni: il lavoro svolto ci ha permesso di rivedere la nostra procedura di validazione dell'ECP. Adotteremo come test funzionale quello con doppia marcatura FITC-Annessina V e 7-AAD e lettura in citofluorimetria a +48h post PUVA. Il test verrà eseguito su ciascun paziente arruolato, durante le prime due procedure, ad ogni modifica del set utilizzato e ad ogni cambio di lotto dell'8-MOP.

Noi non sappiamo quale sia l'impatto che la procedura di ECP possa avere in termini di efficacia clinica o quali delle cellule reinfuse siano biologicamente inattivate o meno attive nel paziente con GvHD. Il follow-up clinico deve rimanere il parametro fondamentale per valutare la risposta al trattamento di ECP perché anche una terapia qualificata diventa clinicamente irrilevante in un paziente che non risponde al trattamento.

INTRODUZIONE

La fototerapia extracorporea (ECP) è un trattamento nel quale leucociti ottenuti mediante procedura aferetica vengono inizialmente trattati con 8-metossipsoralene (8-MOP) e successivamente esposti a irradiazione tramite raggi ultravioletti (UV-A). Una volta terminata tale procedura i leucociti vengono reinfusi nel paziente.

La combinazione di 8-MOP e UV-A, comunemente riportata come PUVA, costituisce un approccio utile al trattamento di patologie dermatologiche, come il linfoma cutaneo a cellule T e altre alterazioni mediate dalle cellule T come anche la Graft versus Host Disease (GvHD) che rappresenta una delle maggiori cause di morbilità e mortalità nei pazienti dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE).

Sebbene non siano ancora perfettamente noti i meccanismi dell'attività terapeutica vi sono numerose evidenze, cliniche e sperimentali, che indicano una possibile immunomodulazione indotta da cellule T e da citochine. (Tassi et al, 2004)

Poiché la fotoferesi extracorporea (ECP) implica il trattamento ex vivo di cellule mononucleate, il controllo di qualità è ritenuto fondamentale al fine della validazione della procedura. Purtroppo, la maggior parte dei lavori presenti in letteratura riporta dati retrospettivi di difficile confronto in quanto i criteri di selezione e di monitoraggio dei pazienti, i programmi di trattamento ed i protocolli di valutazione differiscono nei centri di trattamento.

In assenza di direttive ed evidenze a supporto dell'ECP, la Società Italiana di Emaferesi e Manipolazione cellulare (SIdEM) ed il Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo (GITMO) nel 2013, hanno istituito un gruppo di esperti, selezionati in base alla loro esperienza nella pratica clinica della GvHD, allo scopo di sviluppare delle linee guida che possano risultare utili nella pratica clinica e procedurale dell'ECP. (Pirelli et al, 2013)

Le linee guida pubblicate dal gruppo GITMO/SIdEM e gli standard JACIE, prevedono di effettuare, prima dell'introduzione dell'8-MOP nella sacca e immediatamente prima della reinfusione nel paziente, una serie di controlli di qualità, quali:

- controlli di sterilità per la ricerca di batteri aerobi, anaerobi e funghi. Tali controlli dovrebbero essere fatti se non su tutte, in almeno due procedure offline non consecutive di ciascun trattamento terapeutico.
- test funzionali che riproducono in vitro l'apoptosi indotta nei linfociti dall'8-MOP entro 72/96 h. (Chiericato et al, 2015) (Pirelli et al, 2013)

Viene inoltre raccomandato di riconvalidare il processo in presenza di cambiamenti nella procedura, ad esempio, quando si verifica una modifica del separatore cellulare, dell'illuminatore a raggi UV-A o dei farmaci durante ogni ciclo terapeutico ECP.

In accordo con le linee guida europee per la manipolazione cellulare minima (Direttiva 2006/86/EC; Regolamento N°1394/2007/EC), il trattamento dei linfociti, ottenuti con sistema offline, con 8-MOP deve essere

eseguito sotto cappa a flusso laminare di classe A situata in un laboratorio di classe D.

Da un esame della letteratura, alcuni autori riportano approcci differenti per la validazione della procedura di ECP.

- Jacob et al. (2003), hanno utilizzato la 3-H-timidina radioattiva per quantificare l'inibizione della proliferazione indotta dall'ECP che è risultata essere superiore al 90% in circa il 94% dei casi. (Chierigato et al, 2015)
- Successivamente Evrard et al. (2010) hanno utilizzato sia 3-H-timidina, sia l'estere non radioattivo succinimidico della carbossifluoresceina (CFSE) mediante citometria a flusso con risultati sovrapponibili a quelli di Jacob. (Chierigato et al, 2015)
- Più recentemente, Faivre et al. (2014) hanno utilizzando un saggio di proliferazione basato sull'utilizzo di CFSE con citometria a flusso. È stata riportata una buona concordanza tra l'utilizzo di CFSE e 3-H-timidina. (Chierigato et al, 2015)
- Francesca Taverna et al. (2014) hanno condotto uno studio valutando l'induzione dell'apoptosi linfocitaria precoce e tardiva, generata dopo ECP, su 13 pazienti con cGvHD, usando Annessina V/PI (ioduro di propidio) con tecnica citofluorimetrica. (Taverna 2015)
- Si ritiene che questa metodica sia più veloce e di più facile applicazione rispetto a quella che utilizza CFSE. (Chierigato et al, 2015)
- Chierigato et al. (2015) hanno confrontato due metodi, uno chiamato "apoptosi" e l'altro "analisi di proliferazione" usando rispettivamente Annessina V/7-amminoactinomicina D (7-AAD) e CFSE che impiega un kit commerciale (WST-1). I dati ottenuti hanno dimostrato una diminuzione significativa della proliferazione cellulare (CFSE) e un aumento dell'apoptosi (FITC-Annessina V e 7-AAD). WST-1 potrebbe quindi rappresentare un rapido e semplice test da inserire nella routine del controllo di qualità. (Chierigato et al, 2015)

Il gruppo GITMO/SIdEM ha quindi suggerito per la validazione dell'ECP, l'impiego di test funzionali che, utilizzando l'analisi citofluorimetrica entro 72/96 h dal termine della procedura, valutano il numero dei linfociti non vitali marcati con 7AAD+ con criterio di accettabilità $\geq 50\%$. (Pirelli et al, 2013)

$$\begin{aligned} & \text{Apoptosi totale} = \\ & \% \text{ cell CD45(+)} \text{ late apoptosis} \\ & + \\ & \% \text{ CD45(+)} \text{ early apoptosis 48 h post PUVA} \\ & \text{criterio di accettabilità} \geq 50\% \end{aligned}$$

Figura 1. Formula proposta dai gruppi GITMO/SIdEM per il calcolo dell'apoptosi totale. (Pirelli et al, 2013)

Taverna et al. hanno invece proposto il criterio del Δ apoptosi. La morte cellulare, visualizzata mediante tecnica citofluorimetrica a 48 h, viene espressa dalla seguente formula totale. (Taverna et al, 2015)

$$\begin{aligned} & \Delta \text{ apoptosis} = \\ & (\% \text{ early} + \text{late apoptosis}) \text{ post PUVA} + 48 \text{ h} \\ & - \\ & (\% \text{ early} + \text{late apoptosis}) \text{ pre PUVA} + 48 \text{ h} \\ & \text{criterio di accettabilità} \geq 15\% \end{aligned}$$

Figura 2. Formula proposta Taverna et al. per il calcolo del Δ apoptosi. (Taverna et al, 2015)

ANALISI DATI

La completa inibizione dell'attività di proliferazione cellulare e la forte induzione dell'apoptosi rilevati nelle cellule irradiate tramite fototerapia e aggiunta di 8-MOP viene studiata tramite citofluorimetria a flusso, attraverso la valutazione degli aspetti morfologici o molecolari come la perdita dell'integrità della membrana, la frammentazione cellulare e la fagocitosi di frammenti cellulari da parte di cellule vicine. Presso il settore di Processazione CSE della SC di Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria, vengono effettuati di routine, su ciascuna sacca di ECP raccolta presso il Settore di Aferesi, prima dell'aggiunta di 8-MOP e prima dell'irradiamento con UV-A (PUVA), i seguenti esami per il controllo di qualità (CQ) della raccolta aferetica:

- emocromo per valutare le MNC raccolte;
- vitalità cellulare con test citofluorimetrico;
- test microbiologici per la ricerca di batteri anaerobi, aerobi e funghi.

Le MNC sono state raccolte usando il separatore cellulare SPECTRA-OPTIA e l'ECP è stato eseguito con il metodo offline Vilbert-Lourmat: le cellule sono state irradiate con raggi UV-A per 10' con lo strumento Macogenic (MacoPharma).

Sotto cappa a flusso laminare, le MNC raccolte sono state portate ad un volume di 300 mL con una soluzione salina. La quantità di 8-MOP (0.1 mg/5mL) iniettata nella sacca era di 3 mL.

La sospensione veniva inserita sterilmente in una sacca permeabile ai raggi UV-A (MacoPharma, Francia).

L'intera procedura, dall'avvio della leucoferesi alla reinfusione, ha richiesto in media circa 3 h.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di validare la procedura di ECP offline dopo PUVA, effettuando test funzionali come raccomandato dalle linee guida GITMO/SIdEM.

Attualmente non c'è un accordo generale sul protocollo da adottare per la validazione biologica dell'ECP; si richiede infatti che il test sia riproducibile, affidabile e standardizzabile così che possa essere replicato in ogni laboratorio di processazione.

Poiché, per la nostra procedura di validazione, eravamo alla ricerca di un test che rilevasse il processo apoptotico indotto dall'ECP, abbiamo considerato, dopo revisione della letteratura, di prendere come riferimento la procedura "Controllo di qualità della procedura fotoaferetica" che utilizza la doppia colorazione FITC-Annessina V e 7-AAD e lettura citofluorimetrica. (Astori 2017)

La cinetica dell'apoptosi e la quantificazione precoce (early) e tardiva (late) dell'apoptosi nelle cellule mononucleate (MNC) pre PUVA e post PUVA sono state analizzate con metodica citofluorimetrica presso il laboratorio di citofluorimetria della SC Laboratorio Analisi della nostra Azienda Ospedaliera.

- Sono stati selezionati 9 pazienti (pz.), 4 femmine e 5 maschi, con un'età compresa tra 20 e 63 anni (età media di 50 anni) affetti dalle seguenti patologie ematologiche: LAM (2 pz), ALL (2 pz.), LMC (3 pz), MDS (1pz), HD (1 pz). I pazienti sono stati

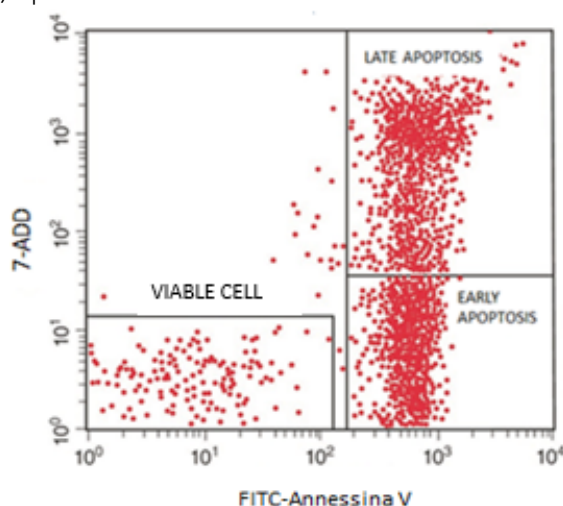
sottoposti ad un trapianto allogenico: 5 da donatore familiare e 4 da donatore MUD.

- Tutti i pazienti hanno sviluppato GvHD, 2 aGvHD e 7 cGvHD, tra questi, 3 pz avevano effettuato un trapianto MUD con 1 MM HLA. Gli organi coinvolti sono stati cute e intestino. Inizialmente i pazienti erano stati trattati con farmaci immunosoppressori quali Ruxolitinib, Steroidi, Tacrolimus/sirolimus, Jakavi e Ciclosporina.
- Tra il 2018 ed il 2020 sono state prese in esame 38 procedure aferetiche. Ogni paziente è stato sottoposto da 1 a 8 procedure.

Le cellule CD45+, campionate dalla sacca di raccolta al termine della procedura aferetica, sono state inviate al laboratorio di citofluorimetria dopo 1 h, 48 h e 96 h. Qui sono state marcate contemporaneamente con FITC-Annessina V e 7-AAD e lette al citofluorimetro.

La doppia colorazione ci ha permesso di:

- visualizzare la cinetica dell'apoptosi indotta dalla procedura PUVA;
- quantificare early e late apoptosis nelle MNC trattate pre e post PUVA.
- visualizzare le cellule vitali (viable cells).



CITOMETRIA A FLUSSO: quantificazione dell'apoptosi cellulare e della morte marcata con FITC-Annessina V e 7-AAD

VITALITA' CELLULARE → CD45 pos / FITC-Annessina V neg / 7-AAD neg

EARLY APOPTOSIS → CD45 pos / FITC-Annessina V pos / 7-AAD neg

LATE APOPTOSIS → CD45 pos / FITC-Annessina V pos / 7-AAD pos

Figura 3. Citometria a flusso: esempio di quantificazione dell'apoptosi cellulare e della morte marcata con FITC-Annessina V e 7-AAD. (Astori 2017).

RISULTATI

I nostri dati sulla cinetica dell'apoptosi hanno mostrato che:

1. Dopo 1 h: nessuno dei 38 campioni testati, aveva un valore di apoptosi totale $\geq 50\%$ e $\Delta \geq 15\%$.

Anche i dati sulla vitalità cellulare media pre e post PUVA, rispettivamente 98,1% e 96,7% erano sovrapponibili e quindi non significativi.

Riteniamo quindi che il periodo di tempo intercorso pre-post PUVA sia troppo breve per poter osservare il processo apoptotico.

Anche in letteratura non abbiamo trovato lavori con cui confrontare questi dati.

2. Dopo 48 h: abbiamo suddiviso le procedure in due gruppi, tabella 1a e 1b.

La tabella 1a comprende i dati relativi a 31 controlli (81,5%) che rispettano i criteri di accettabilità pre e post PUVA rivelando l'efficacia del trattamento PUVA in vitro. I nostri risultati correlano con quelli presenti nel lavoro di Taverna et al.

Per quanto riguarda l'apoptosi totale, osserviamo una media di 80,21%, mentre i valori di Δ hanno una media di 40,96%.

In particolare, i dati della cinetica dell'apoptosi pre-post PUVA mostrano un piccolo incremento nella early apoptosis (media 19,3% vs 25,1%) mentre nella late apoptosis (media 20,0% vs 55%) la percentuale di cellule morte osservate era notevolmente aumentata. La vitalità cellulare pre-post PUVA era rispettivamente (media 60,18% vs 18,13%).

In due campioni (n°4 e n°22), pur essendo rispettati i criteri di accettabilità sia per l'apoptosi totale (91,76%) sia per il Δ (19,11%), abbiamo osservato che la vitalità pre PUVA era rispettivamente 27,08% e 26,38% rispetto alla media (60,1%) suggerendo quindi l'attivazione di un processo apoptotico spontaneo probabilmente dovuto allo stato clinico dei pazienti o ai farmaci assunti.

La tabella 1b riporta invece i dati riguardanti 7 dei 38 controlli (18,5%) che non rispettano i criteri di accettabilità. Per quanto riguarda l'apoptosi totale, 5 procedure non hanno raggiunto i criteri di accettabilità (media 13,2%), 4 procedure non hanno raggiunto i criteri di accettabilità sia per l'apoptosi totale sia per il Δ (media 10,5%) e 6 procedure (media 15,8%) non hanno raggiunto la soglia minima di accettabilità del Δ .

In particolare, i dati della cinetica dell'apoptosi pre e post PUVA mostrano una piccola diminuzione nella early apoptosis (media 12,3% vs 6,7%) mentre nella late apoptosis (media 14,4% vs 27,4%) la percentuale di cellule morte è aumentata.

La vitalità cellulare pre-post PUVA era rispettivamente in media (72,7% vs 61,8%).

I nostri dati (18,5%) sono in linea con quelli presentati nel lavoro di Taverna et al. (31), dove il 19,4% di 31 procedure aveva un $\Delta < 15\%$.

Riteniamo che i valori ottenuti non siano solo causati dall'insuccesso del trattamento PUVA ma anche da problemi legati all'apoptosi spontanea dovuta alle condizioni cliniche del paziente (es. insorgenza di sepsi in due pazienti).

In questi pazienti il trattamento con ECP è stato sospeso in quanto non efficace, avvalorando il dato rilevato dagli studi effettuati in vitro.

3. Dopo 96 h: in tabella 9 sono riportati i dati riguardanti 8 (21,05%) dei 38 campioni esaminati. I campioni che rispettano i criteri di accettabilità dell'apoptosi totale e del Δ apoptosis sono 7.

Un solo campione, il n°33, mostra invece un valore di Δ apoptosis pari a -4,27% che già a +48 h era 4.85%. Pur avendo quindi protratto l'incubazione di ulteriori 48 h, come suggerito nella procedura "Controllo di qualità della procedura fotoferetica" (Astori, 2017) il Δ ottenuto non è risultato accettabile. Riteniamo tuttavia che il dato non sia rilevante in quanto trattasi di un unico campione.

N°	Paziente	Data fototerapia	WBCx 10 ³ /µL pre-PUVA	(%) Vitalità 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Early apoptosis 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Late apoptosis 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Vitalità 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Early apoptosis 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Late apoptosis 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	apoptosi totale % late apoptosis + % early apoptosis 48 h post-PUVA criterio di accettabilità ≥ 50%	Δ apoptosis (%early apoptosis + %late apoptosis) post-PUVA +48h - (%early apoptosis + %late apoptosis) pre-PUVA +48h criterio di accettabilità ≥ 15%
1	D.D.	02/10/18	85,21	65,07	15,06	19,26	9,78	28,35	61,32	89,67	55,35
2	D.V.	03/10/19	51,44	73,79	14,75	11,41	22,8	21,68	55,38	77,06	50,9
3	D.D.	09/10/18	76,85	47,04	14,91	37,8	11,64	20,21	67,74	87,85	35,24
4	B.H.	10/10/18	73,93	27,06	26,76	45,89	7,91	39,62	52,14	91,76	19,11
5	D.D.	15/10/18	58,57	61,13	16,52	22,1	11,08	29,04	59,39	88,43	49,81
6	F.M.C.	16/10/18	67,45	66,71	18,03	15,19	20,82	29,63	48,94	78,57	45,35
7	D.D.	22/10/18	38,46	79,59	9,75	10,41	3,75	20,44	74,22	94,66	74,5
8	D.D.	29/10/18	73,47	66,3	14,41	19,21	6,02	32,23	60,66	92,89	59,27
9	D.D.	6/11/18	89,97	60,68	18,8	20,43	12,38	30,19	57,08	87,27	48,04
10	D.D.	4/12/18	47,93	53,41	28,88	17,62	10,5	22,01	67,01	89,02	42,52
12	T.R.	19/3/19	62,07	53,03	25,76	21,21	6,79	25,05	68,14	93,19	46,22
13	T.R.	27/3/19	65,03	70,68	10,97	16,34	11,03	22,04	49,24	71,28	43,97
16	T.R.	9/4/19	58,16	52,58	42,68	4,61	22,01	39,01	37,71	76,72	29,43
17	S.M.	9/4/19	26,69	66,72	26,71	6,4	28,15	20,17	42,63	62,8	29,69
18	S.M.	15/4/19	29,29	47,64	37,94	14,07	22,31	25,03	49,98	75,01	23
19	T.R.	16/4/19	42,95	66,39	19,34	14,18	31,54	15,21	42,4	57,61	24,09
22	T.R.	27/5/19	29,82	26,38	24,32	42,14	11,57	38,51	49,83	88,34	21,88
23	S.M.	3/6/19	61,17	71,82	14,43	13,6	37,8	15,15	43,7	58,85	30,82
24	T.R.	5/6/19	26,54	68,16	13,94	17,48	51,49	15,2	40,69	55,89	24,47
25	C.D.	27/1/20	42,48	78,53	11,31	9,94	16,76	25,21	56,94	82,15	60,9
26	M.G.	29/1/20	46,89	62,18	15,53	21,81	5,49	28,82	62,73	91,55	54,21
27	C.D.	5/2/20	40,91	67,73	14,77	17,3	34,43	14,97	48,08	63,05	30,98
28	C.D.	10/2/20	71,64	65,89	13,17	20,63	13,9	14,62	72,93	87,55	53,75
30	C.D.	17/2/20	45,34	60,52	14,28	24,97	9,93	14,38	70,45	84,63	45,58
31	C.D.	4/5/20	51,21	55,27	21,18	23,41	14,39	34,41	49,36	83,77	39,18
32	C.D.	18/5/20	51,10	62,68	12,26	24,64	8,68	17,16	72,63	89,79	52,89
34	C.D.	1/6/20	45,29	69,83	11,13	20,74	25,02	21,72	52,41	74,13	42,26
35	M.G.	8/6/20	18,68	42,54	26,03	30,29	13,31	34,63	50,12	84,75	28,43
36	C.D.	15/6/20	29,22	58,75	27,5	13,69	31,34	24,05	58,03	82,08	40,89
37	M.G.	16/6/20	21,5	54,73	22,48	22,41	11,76	27,97	59,2	87,17	42,28
38	M.G.	18/6/20	12,62	63,73	14,62	19,36	37,71	30,96	27,84	58,8	24,82

Tabella 1a. Campioni che rispettano i criteri di accettabilità a +48 h

N°	Paziente	Data fototerapia	WBCx 10 ³ /µL pre-PUVA	(%) Vitalità 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Early apoptosis 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Late apoptosis 48 h pre-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Vitalità 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Early apoptosis 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	(%) Late apoptosis 48 h post-PUVA Campione diluito a WBC 1x10 ³ /µL	apoptosi totale % late apoptosis + % early apoptosis 48 h post-PUVA criterio di accettabilità ≥ 50%	Δ apoptosis (%early apoptosis + %late apoptosis) post-PUVA +48h - (%early apoptosis + %late apoptosis) pre-PUVA +48h criterio di accettabilità ≥ 15%
11	T.R.	13/3/19	51,33	94,8	4,41	0,61	85,68	4,21	8,97	13,18	8,16
14	T.R.	2/4/19	50,13	76,59	18,26	4,51	47,42	7,24	35,81	43,05	20,28
15	S.M.	2/4/19	20,48	88,8	5,95	4,69	82,36	1,7	6,86	8,56	-2,08
20	G.G.	30/4/19	4,47	92,28	1,68	5,6	80,76	2,54	12,85	15,39	8,11
21	G.G.	6/5/19	8,61	98,53	0,74	0,47	97,39	1,43	0,98	2,41	1,2
29	M.G.	12/2/20	40,29	37,94	22,17	39,3	25,09	13,14	58,89	72,03	10,56
33	M.G.	25/5/20	23,91	20,21	33,47	45,46	14,14	16,37	67,41	83,78	4,85

Tabella 1b. Campioni che non rispettano i criteri di accettabilità a +48 h

CONCLUSIONI

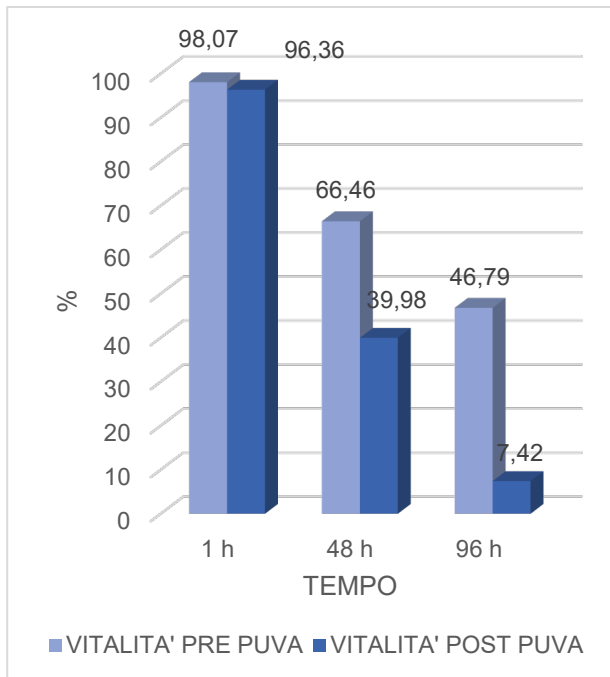


Grafico 1. Vitalità cellulare media a 1 h, 48 h, 96 h. Come possiamo vedere nel grafico 1 la vitalità cellulare media ha un calo con il passare del tempo, sia per apoptosi spontanea (pre PUVA), sia per il trattamento PUVA. Possiamo osservare come sia molto più drastico il decremento indotto da PUVA, dimostrando l'efficacia del trattamento.

Nel grafico 2 osserviamo la early apoptosis. A 1 h e a 48 h non abbiamo una significativa differenza tra prodotto trattato con PUVA e non, mentre a 96h la differenza è più marcata.

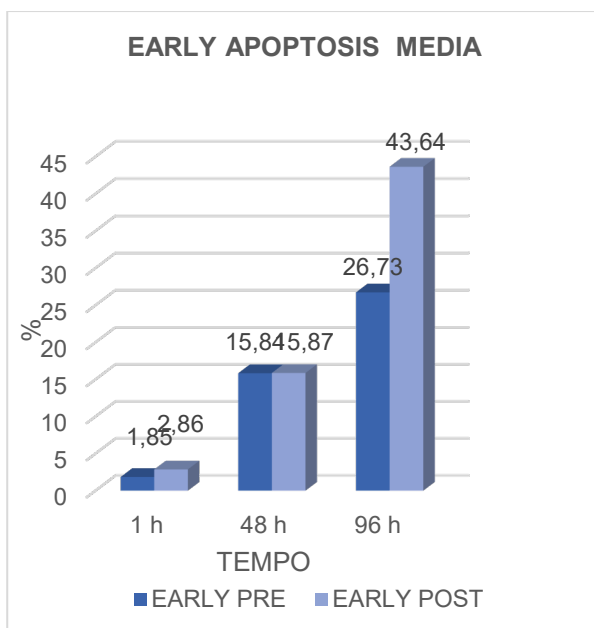


Grafico 2. Early apoptosis media a 1 h, 48 h, 96 h.

Nel grafico 3 possiamo invece notare come la late apoptosis fornisca un dato più significativo. Dopo 48 h e dopo 96 h abbiamo un'importante differenza tra pre e post PUVA, confermando quindi l'efficacia del trattamento.

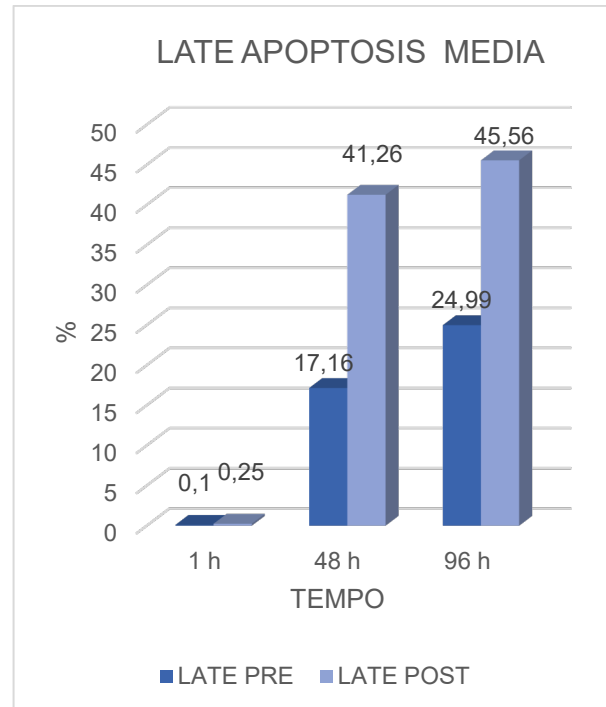


Grafico 3. Late apoptosis media a 1 h, 48 h, 96 h.

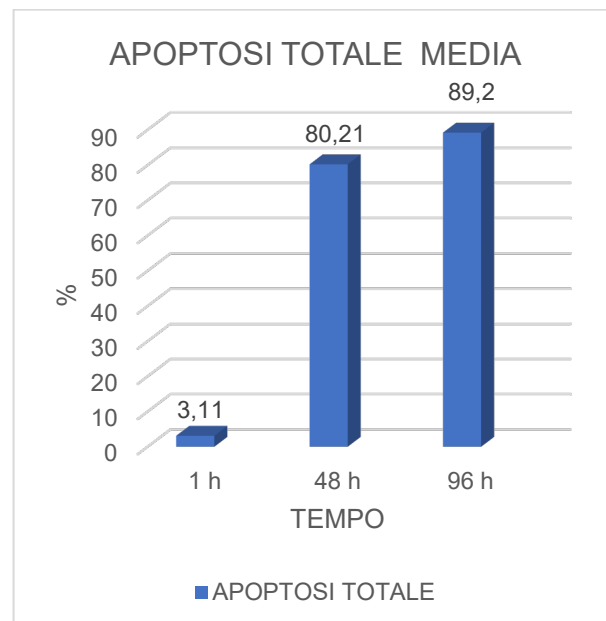


Grafico 4. Apoptosi totale media a 1 h, 48 h, 96 h.

Nel grafico 4 possiamo osservare come il valore dell'apoptosi totale sia sovrapponibile dopo 48 e 96 h (rispettivamente 80,21 e 89,2%). Il dato avvalorata la decisione di inserire nel nostro protocollo i controlli a +48 h.

Nel grafico 5 possiamo vedere come il dato a 48 h rappresenti l'apice dei risultati. La somma di late e early apoptosis post PUVA è decisamente maggiore rispetto ai dati pre PUVA. Questa è un'ulteriore conferma sull'efficacia del trattamento e della decisione di inserire nel nostro protocollo di validazione i controlli a +48h.

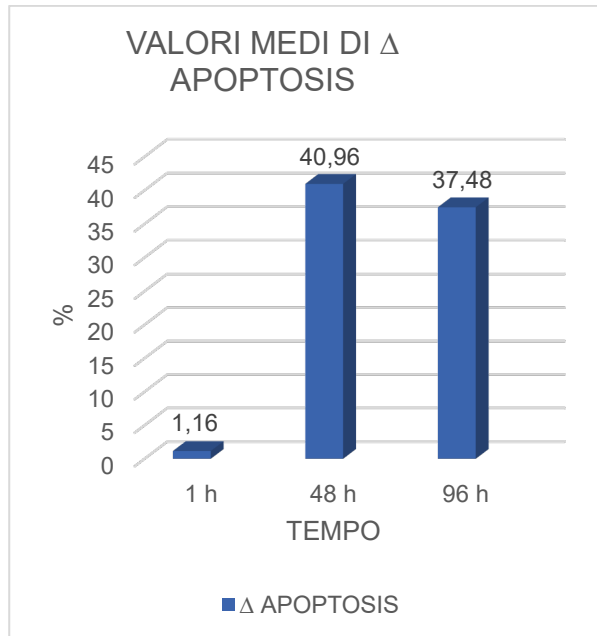


Grafico 5. Valori medi di Δ apoptosis a 1 h, 48 h, 96 h.

Essendo l'ECP una forma di terapia cellulare che impiega una manipolazione minima, riteniamo che la qualità debba essere monitorata sia in ciascun paziente arruolato per il trattamento della GvHD sia per ogni cambiamento che risulti cruciale nella procedura, come suggerito dalle linee guida GITMO/SIdEM e dagli standard JACIE.

I test funzionali che abbiamo utilizzato in questo studio riproducono in vitro gli effetti dovuti all'attivazione dell'8-MOP.

È chiaro che le analisi eseguite in vitro sono retrospettive e non possono essere usate ai fini del rilascio del

prodotto irradiato, appare però mandatoria la verifica dell'accuratezza dell'intero processo.

I nostri dati suggeriscono che l'utilizzo della doppia colorazione con FITC-Annessina V e 7-AAD e conseguente lettura citofluorimetrica possa rappresentare un metodo affidabile e riproducibile da utilizzare per la validazione biologica dell'ECP.

Sebbene la citofluorimetria a flusso, da un lato, presenti alcuni inconvenienti, come la mancanza di standardizzazione e la soggettività nell'analisi dei dati, dall'altro ci permette di misurare contemporaneamente parametri come proliferazione, vitalità, immunofenotipo, morfologia e cinetica dell'apoptosi. Le raccomandazioni GITMO/SIdEM consigliano inoltre di effettuare i test funzionali entro 72/96 h dal termine della procedura.

Nella nostra casistica abbiamo osservato come i linfociti trattati con PUVA morissero per apoptosi già a +48 h. La cinetica dell'apoptosi è decisamente evidente sia nella late apoptosis sia nel dato di vitalità cellulare. Non riteniamo significativi i dati a 96h, anche se accettabili sia in termini di apoptosi totale sia di delta, in quanto i test sono stati eseguiti solo su 8 pazienti.

Il lavoro svolto ci ha permesso di rivedere la nostra procedura sui controlli di qualità dell'ECP. Adotteremo come test funzionale quello con doppia marcatura FITC-Annessina V e 7-AAD e lettura in citofluorimetria a +48 h post PUVA. Il test verrà eseguito su ciascun paziente arruolato, durante le prime due procedure, ad ogni modifica del set utilizzato e ad ogni cambio di lotto dell'8-MOP.

Noi non sappiamo quale sia l'impatto che la procedura di ECP possa avere in termini di efficacia clinica o quali delle cellule reinfuse siano biologicamente inattive o meno attive nel paziente con GvHD. Il follow-up clinico deve rimanere il parametro fondamentale per valutare la risposta al trattamento di ECP perché anche una terapia qualificata diventa clinicamente irrilevante in un paziente che non risponde al trattamento.

Bibliografia

1. Astori G. "Controllo qualità della procedura fotoaferetica" (2017), Personal Communication;
2. Chierigato K., Alghisib A., Borghero C., Elice C. et al. "Evaluation of lymphocytes inactivation by extracorporeal photopheresis using tetrazolium salt based-assay", (2015), Transfusion and Apheresis Science Volume 53, Issue 2, Pages 242-245;
3. Pirelli L., Bosi A. for SIdEM (Società Italiana di Emaferesi e Manipolazione Cellulare) / GITMO (Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo) ECP Expert Panel, "Extracorporeal photopheresis guidelines GITMO / SIdEM" (24,25,26 gennaio 2013);
4. Tassi C., Tazzari P. L., Ricci F., et al., "In vitro assay for candidates to extracorporeal photochemotherapy (ECP)" (2004), 2 55-68;
5. Taverna F., Coluccia P., Arienti F., et al., "Biological Quality Control for Extracorporeal Photochemotherapy: Assessing Mononuclear Cell Apoptosis Levels in ECP Bags of Chronic GvHD Patients", (2015).