

IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE MYELOMOVÝCH BUNĚK

IMMUNOMAGNETIC SEPARATION OF MYELOMA CELLS

¹FIŠEROVA A.,^{1,2}HAJEK R.,²DOUBEK M.,¹BULIKOVA A.,¹BOURKOVA L.,²BANOVSKA A.,
¹VIDLAKOVA P.,¹TUZOVA E.,¹MARESCHOVA I.,²VORLIEEK J.,¹PENKA M.

LABORATOŘ EXPERIMENTALNI HEMATOLOGIE A BUNIENÉ IMUNOTERAPIE,
¹ODDILENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, ²INTERNI HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO-BOHUNICE

Souhrn: Myelomové buňky vykazují značnou fenotypickou heterogenitu. V všechny plazmatické buňky exprimují CD38 ve vysoké denzitě (CD38⁺⁺). Syndecan-1 (CD138 antigen) byl detekován na monoklonální populaci CD38⁺CD45⁻ a CD38⁺CD45^{dim+} a byla prokázána heterogenita v jeho expresi. Cílem naší práce bylo připravit vitální buněčnou suspenzi o vysoké čistotě myelomových buněk pomocí imunomagnetické separace. Vitalita buněk není procedurou významně ovlivněna, čehož lze s výhodou využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk. K separaci bylo použito osm vzorků aspiračních biopsií pacientů s mnohočetným myelomem. V naší laboratoři jsme zvolili dva způsoby separace myelomových buněk: pozitivní selekci CD138⁺ buněk a kombinaci deplece CD45⁺ buněk s pozitivní selekcí CD138⁺ buněk z frakce CD45⁻. Vitalita vyseparovaných buněk (medián, rozpětí) byla 98,0% (97,0%-99,0%), čistota dle flowcytometrické detekce CD138 v jedнокrokové proceduře (medián, rozpětí) byla 78,9% (74,9%-87,4%), ve dvoukrokové proceduře 84,3% (74,8%-94,5%). Morfologické hodnocení čistoty jedné jedнокrokové procedury s výsledkem 99,6% a jedné dvoukrokové procedury se 100,0% plazmatických buněk ukazuje na preferenční kontaminaci plazmatickými buňkami, které nenesou znak CD138. Pomocí imunomagnetické separace jsme ze vzorku kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem připravili buněčnou suspenzi o vysokém zastoupení vitálních myelomových buněk s širokou využitelností v experimentální oblasti.

Klíčová slova: Imunomagnetická separace - Mnohočetný myelom - Syndecan-1

Summary: Myeloma cells display considerable phenotypic heterogeneity. All plasma cells express high density CD38 (CD38⁺⁺). Syndecan-1 (CD138 antigen, B-B4) was detected in monoclonal populations CD38⁺CD45⁻ and CD38⁺CD45^{dim+} and heterogeneity of its expression was proven. The work presented aimed at preparation of a high-purity vital cell suspension of myeloma cells by immunomagnetic separation. There is no significant vitality change, which may be of advantage for experiments in which cultivation of the cells is necessary. Eight samples of aspiration biopsy from patients with multiple myeloma were used. Two methods of separation were evaluated: either positive selection of CD138⁺ cells or the same method on the fraction which has been depleted of its CD45⁺ cells. Vitality of the separated cells (median, range) was 98% (97%-99%), purity, as detected flowcytometrically by CD138, was 78.9% (74.9%-87.4%) in one-step and 84.3% (74.8%-94.5%) in two-steps procedures. The purity was further assessed morphologically in one one-step procedure (99.6% of plasma cells) and in one two-steps procedure (100.0% of plasma cells). It displays a preferential contamination with plasma cells without CD138 marker. High purity vital myeloma cells suspension was prepared from bone marrow tissue samples of multiple myeloma patients. Ample application range in the experimental field is suggested.

Key words: Immunomagnetic separation - Multiple myeloma - Syndecan-1

Úvod

Mnohočetný myelom je onemocnění dosud považované za nevléčitelné [6]. Studium biologie maligního klonu plazmatických buněk má proto své opodstatnění. V naší práci jsme se zaměřili na separaci myelomových buněk z kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem, která by umožňovala rozšíření experimentálních eventuálně terapeutických možností. Četné studie vyžadují buňky se zachovanou vitalitou a funkčními vlastnostmi. Proto jsme zvolili imunomagnetickou separaci (magnetic-activated cell separation, MACS) vyvinutou Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). Tato metoda umožňuje selekci buněk podle jejich povrchového CD znaku pomocí monoklonální protilátky konjugované se superparamagnetickou partikulí. Vitalita buněk není procedurou významně ovlivněna, čehož lze s výhodou využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk (stanovení labelling indexu, cytogenetické studie, produkce imunoglobulinu, produkce cytokinů aj.). Morfologický obraz buněk ve světelném mikroskopu není ovlivněn.

Maligní plazmatické buňky pacientů s mnohočetným myelomem vykazují značnou fenotypickou heterogenitu. Na

jejich imunofenotypizaci bylo již zaměřeno mnoho prací [1,21]. Všechny plazmatické buňky exprimují vysokou intenzitu CD38 (CD38⁺⁺). Jde o adhezivní molekulu, která zprostředkuje interakci s vaskulárními endoteliálními buňkami [7,9,16]. Tento znak je exprimován též na pre B buňkách, nezralých T buňkách, aktivovaných T buňkách a monocytech. Většina CD34⁺ buněk je též CD38⁺ [22]. Expresí CD45 se snižuje během vývoje plazmatických buněk. Zralé ztrácejí tento antigen [18,23].

Rozlišujeme subpopulaci zralých (CD 45⁻), nezralých (CD45⁺) a primitivních (CD45⁺⁺CD19⁺) plazmatických buněk. Ze zralých plazmatických buněk definovaných jako CD38⁺⁺CD45⁻ je méně než 4% CD19⁺, více než 86% CD38⁺⁺CD19⁺ je buď CD45⁺ nebo CD45⁺⁺ [14].

Syndecany patří mezi transmembránové proteoglykany, které mohou prostřednictvím heparansulfátového řetězce zprostředkovat vazbu růstových faktorů. Účastní se interakcí buňka a buňka: intersticiální matrix. Expresí syndecanu-1 na normálních B buňkách je podobná expresi CD38 a je závislá na stadiu vývoje. Oba markery jsou přítomny na pre-B buňkách, jsou ztraceny s diferenciací a opět exprimovány ve stadiu plazmatických buněk [22,23]. Syndecan-1 váže buňky

k různým komponentám intersticiální matrix (kolagen I, III, V, fibronectin, trombospondin, tenascin). Gen pro syndecan-1 je lokalizován na chromosomu 2p23[2,16].

Expresí syndecanu-1 byla popsána na plazmatických buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů s mnohočetným myelomem [4,16,23]. Syndecan-1 byl detekován na monoklonální populaci CD38+45- a CD38+45dim+ a byla prokázána heterogenita v jeho expresi. Diferenciace B buněk na plazmatické buňky je provázena ztrátou CD45 a získáním syndecanu-1. Syndecan-1 je exprimován před terminální diferenciací plazmatických buněk [23]. Myelomové buňky exprimující syndecan-1 produkují relativně nízké hladiny matrix-metaloproteinázy-9 (proteinu s možnou rolí v patogenezi mnohočetného myelomu)[11].

Imunomagnetickou separaci myelomových buněk dle znaku CD138 popisuje Borset [3], dosahuje čistoty nad 99 % (hodnoceno morfologicky), vitality nad 80 %. Ve své práci prokazuje, že B-B4 protilátka (anti-CD138) neovlivňuje proliferaci a produkci cytokinů myelomových buněčných linií. Drach [5] též separuje touto metodou s čistotou CD138+ frakce dle morfologie 99 %. Losieau [8] dosahuje mediánu čistoty dle morfologie 93 % (78 %-99 %). Depleční metodu s koktailem protilátek CD3, CD11b, CD14, CD33, CD45 a CD45RA, CD32 a anti-glycoforin A s dosažením čistoty dle morfologie nad 95 %, dle flowcytometrické detekce dvojkombinace CD38+CD45RA- nad 95%, s vitalitou 99 % a s návratností myelomových buněk nad 95 % popisuje Tai [20].

V naší laboratoři jsme zvolili dva způsoby separace myelomových buněk: pozitivní selekci CD138+ buněk a kombinaci deplece CD45+ buněk s pozitivní selekci CD138+ buněk z frakce CD45-.

Metody:

Myelomové buňky byly separovány ze vzorků aspiračních biopsií kostních dření získaných současně s rutinními diagnostickými odběry. S použitím části vzorku pro výzkumné účely vyjádřil pacient informovaný souhlas. Charakteristiky pacientů udává tabulka č. 1. Kostní dřeň o objemu většinou 20 ml,(6-30)ml byla odebrána do heparinu. Vzorky s nálezem nad 5 % plazmatických buněk v nátěru byly dále separovány. Celkem bylo provedeno 8 MACS separací, 4 jedнокrokové a 5 dvoukrokových (2 vzorky provedeny oběma způsoby). Jedna separace byla komplikována shlukováním buněk v průběhu separace. U dalších vzorků proto zavedeno užití DNase (endonukleáza štěpící DNA).

Ihned po odběru byl vzorek smíchan s IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma, I 7633, 2 ml/1ml kostní dřeně), heparinem (Léčiva, 100 U/ml kostní dřeně), DNase (Boehringer Mannheim, No: 1284 932, 100 U/ml kostní dřeně) a jemně třepán. Mononukleární buňky kostní dřeně byly získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque - 1077 (Sigma, No: H-8889). Centrifugace 400g, 35 min., 4 °C (centrifuga JOUAN CR 312). Cílem gradientové centrifugace bylo též očištění vzorku o mrtvé buňky, které mají tendenci k nespecifickému značení

Tabulka č. 1: Charakteristiky pacientů.

Pacient č.	Nátěr KD, pl. bb. (%)	Stadium	Typ Ig
1	56,8	III A	IgG kappa
2	66,0	III A	IgG kappa
3	32,0	III A	IgG kappa
4	38,0	I A	IgG kappa
5	83,0	III A	IgG lambda
6	14,0	III A	IgG kappa
7	6,4	III A	IgG kappa
8	16,8	III A	IgG kappa

a záchytu v koloně. V jedнокrokové proceduře by tak mohly výrazně kontaminovat pozitivní frakci. Po dvojnásobným promytím v PBS + 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min., 4 °C) bylo provedeno magnetické značení.

Jedнокroková procedura – pozitivní selekce CD138+ buněk: Mononukleární kostní dřeně jsou značeny protilátkou anti-CD138 (B-B4) v dávce 20 µl s 80 µl roztoku (PBS+2mM EDTA+0,5 % humánní albumin+azid sodný) / 10⁷ buněk (CD 138 (Syndecan-1) MicroBeads, Miltenyi Biotec, No: 513-01), inkubace 15 min., 6-12 °C. Po promytí je značená suspenze aplikována přes filtr 30 µm (NO: 414-07) do kolony CS (Miltenyi Biotec, No: 413-05) umístěné v magnetickém poli separátoru. Byl použit flow resistor 20G, separátor VarioMACS (No: 431-02) s permanentním magnetem 0,6 T. Negativní buňky projdou kolonou, pozitivní získáme po odstranění kolony z magnetu.

Dvoukroková procedura-kombinace deplece CD45+ buněk a pozitivní selekce CD138+ buněk z frakce CD 45-:

Mononukleární kostní dřeně jsou nejprve značeny protilátkou anti CD45 (CD45 MicroBeads, Miltenyi Biotec, No: 458-01), aplikovány do kolony, pozitivní buňky jsou zachyceny v koloně, negativní jsou dále značeny pomocí monoklonální protilátky B-B4 a aplikovány do kolony. Frakce buněk CD138+ je získána po odstranění kolony z magnetického pole. Veškeré manipulace byly provedeny ve sterilním laminárním flowboxu (GÉLAIRE BSB 6A).

Hodnocení kvality magnetické separace:

Za tímto účelem byly provedeny odběry ze vstupního vzorku (mononukleární buňky kostní dřeně) a dále z jednotlivých frakcí (CD138+, CD138- v jedнокrokové proceduře a CD45+, CD45-, CD45-138+, CD45-138- ve dvoukrokové proceduře).

Hodnocení vitality:

Buněčná suspenze 1 x 10⁶/ml je značena směsí barviv (ethidium bromid+acridinová oranž) a aplikována do Bürkerovy komůrky. Fluorescenčním mikroskopem (Olympus BH-2) je hodnoceno % vitálních (zelených) buněk z celkového počtu buněk.

Morfologické hodnocení:

Ze vzorků jednotlivých frakcí jsou připraveny cytospinové preparáty (1,5 x 10⁵ buněk) a barveny (May-Grünwald-Giemsa). V rámci standardní diagnostiky provedeno též hodnocení nátěru kostní dřeně. Z jednotlivých preparátů byl proveden rozpočet přítomných elementů (hodnoceno na 250 jaderných buněk) v mikroskopickém odečtu (mikroskop Olympus BH-2, zvětšení 1000 x) a vyjádřeno procentuální zastoupení myelomových buněk.

Flowcytometrická detekce povrchových CD markerů:

K detekci myelomových buněk a buněk kontaminujících byly použity následující protilátky: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD45, anti-CD38, anti-CD54, anti-CD138, pro trojbarevnou analýzu byly použity tyto kombinace protilátek: anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 54, anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 56 a anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 138 [Immunotech (Francie) a Caltag (USA)] značených R-fycoerythrinem (R-PE), fluorescein isothiocyanátem (FITC) a R-phycoerytrin-Cy5 (TC). 50 µl vzorku bylo inkubováno s protilátkami v saturujících koncentracích. Vzorek byl po inkubaci s protilátkami (20 minut při teplotě 4 °C a 10 minut při 20 °C) a zafixován v přístroji Q-Prep (Coulter, USA). Takto zpracované vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Epics XL (Coulter, USA). Metodika trojbarevné flowcytometrické analýzy byla již detailně popsána [12]. Panel vyšetřených CD znaků byl volen tak, aby stanovil procento myelomových buněk a detekoval buňky, které frakci kontaminují. Počet odebraných buněk na každý vzorek byl 1 x 10⁶.

Určování počtu buněk:

Počet buněk stanoven na ABBOTU 3500.

Stanovení návratnosti myelomových buněk TCR (Target cell recovery):

$$\text{TCR} (\%) = 100 \times \frac{\text{počet buněk v pozitivní frakci} \times \% \text{ poz. buněk v poz. frakci}}{\text{počet buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ poz. buněk ve vstup. vz.}}$$

Stanovení celkové návratnosti buněk OCR (Overall cell recovery):

$$\text{OCR} (\%) = 100 \times \frac{\text{poč. buněk v poz. frakci} + \text{poč. buněk v neg. frakci}}{\text{počet buněk ve vstup. vzorku}}$$

Stanovení indexu obohacení fE (Enrichment rate):

Jde o průměrný počet negativních buněk, které prošly kolonou v poměru k počtu negativních buněk zachycených nespecificky v koloně, za předpokladu, že všechny pozitivní buňky byly zachyceny v koloně.

$$\text{fE} = \frac{\% \text{ neg. buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ poz. buněk v poz. frakci}}{\% \text{ poz. buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ neg. buněk v poz. frakci}}$$

Výsledky

Výtěžnost mononukleárních buněk (medián, rozpětí) byla 2,7 (0,7-10,6) x 10⁶ / ml kostní dřeně.

Vitalita:

Vitalita vstupního vzorku (medián, rozpětí) byla 98,5 % (95,0 % -99,0 %), frakce myelomových buněk po separaci 98,0 % (97,0 % -99,0 %).

Morfologické hodnocení:

V nátěru kostní dřeně provedeném v rámci standardní diagnostiky byl nalezen plazmatických buněk 38,0 % (6,4% až 83,0 % (medián, rozpětí). Cytospinové preparáty jednotlivých frakcí byly hodnoceny u jedné jedнокrokové separace (pokus č.8). V nátěru plně kostní dřeně bylo 16,8 % plazmatických buněk. Vstupní vzorek (mononukleáry kostní dřeně) obsahoval 36,9 % plazmatických buněk (foto č. 1). Ve frakci CD138+ bylo 99,6 % (foto č. 2), ve frakci CD138- 28,3 %. V jedné dvoukrokové separaci byly hodnoceny nátěry (pokus č.7). V nátěru plně kostní dřeně bylo zjištěno 6,4 % plazmatických buněk. Ve vstupu bylo 11,6 %, ve frakci CD45+ 8 %, CD45-22 %, CD45-CD138+ 100 %, CD45-CD138- 5 %.

Flowcytometrické hodnocení čistoty shrnuje tabulka č. 2.

Celková návratnost buněk byla v jedнокrokových procedurách 86,1% (80,7%-89,8%), ve dvoukrokových procedurách 69,7% (59,9%-81,1%)(medián, rozpětí).

Současně s pozitivní selekcí dle znaku CD138 dochází ke změněm procentuálního zastoupení znaků jiných. Pravidelně k depleci CD3+ buněk a CD19+ buněk (data nepublikována).

Ve dvoukrokových procedurách je ve frakci CD45+ ztraceno ne bezvýznamné procento buněk nesoucích znak CD138. V jednom z pokusů dosáhla ztráta 71,9%.

Diskuse:

Cílem naší práce byla separace vitálních myelomových buněk z kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem pomocí imunomagnetické separace.

Z morfologických preparátů je patrná tendence myelomových buněk ke shlukování. Populace buněk přítomných ve shluku pravděpodobně není homogenní. Znak CD138 je exprimován též v populaci pre B lymfocytů [23]. To vysvětluje možnou přítomnost mladých forem. Rozdíly ve

výsledcích čistoty zjištěné morfologicky a flowcytometricky pomocí znaku CD138 ukazují na přítomnost plazmatických buněk, které nenesou znak CD138. Příčinu této preferenční kontaminace pravděpodobně mladšími formami buněk, které nenesou znak CD138, zbývá objasnit. Mohlo by jít o interakci buňka: buňka vysvětlitelnou na molekulární úrovni. Kawano [10] ve své práci popisuje spontánní homotypickou agregaci myelomových buněk zprostředkovanou molekulami ICAM-1 a LFA-1. Při hodnocení čistoty je nutno zvážit metodu hodnocení. Většina publikovaných prací vyjařuje výsledky čistoty dle morfologického hodnocení. Z pohledu našeho dalšího využití není tato kontaminace na závadu, v některých pokusech by mohla být spíše výhodou. Další zvyšování čistoty podle znaku CD138 nutno řešit individuálně. Teoreticky by mohlo docházet ke změněm procentuálního zastoupení buněk nesoucích znak CD14 jednak z důvodu současné exprese Fc receptoru a nespecifického značení těchto buněk vazbou Fc koncem magneticky značené protilátky (blokátor Fc receptoru nebyl používán, nutnost jeho užití zbývá doložit na základě většího počtu experimentů), jednak z důvodu možné koexpresy CD14 a CD138 antigenů. Expresy myelomonocytárních antigenů (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33) byla popsána s různou frekvencí 6-65% pacientů s mnohočetným myelomem [1].

Vzhledem k tomu, že určení počtu buněk může být zatíženo chybou a flowcytometrické vyšetření má subjektivní složku, mohou snadno pokusy se skutečnou hodnotou návratnosti myelomových buněk blízkí se 100% překročit tuto hodnotu. To je ve shodě s již publikovanými daty.

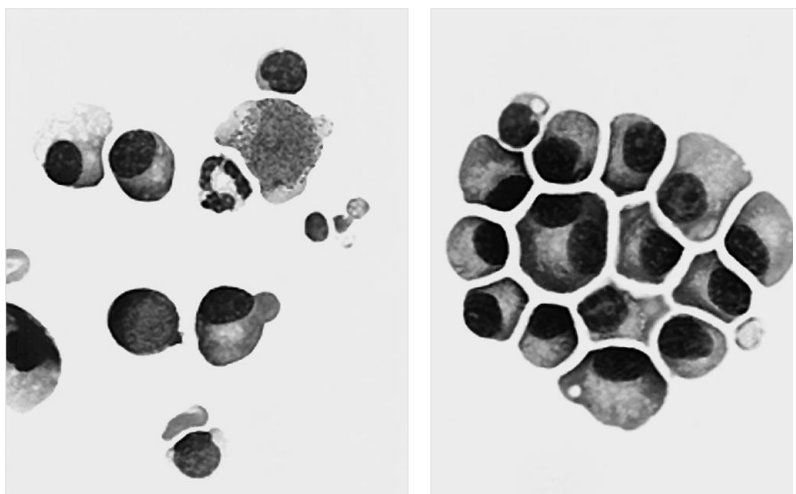
K zachytu v koloně je dostatečné magnetické značení pouze malé části povrchových receptorů. Proto buňky CD45dim+138+ mohou být v prvním kroku dvoukrokové procedury ztraceny. Syndecan-1 byl detekován na monoklonální populaci CD38+45- a CD38+45dim+ [23]. Tím je ovlivněna i návratnost myelomových buněk ve dvoukrokových procedurách. Získání buněk CD45dim+138+ by vyžadovalo další separační krok s použitím odznačujícího reagentu a nového magnetického značení CD138. Nutno však zdůraznit ekonomickou náročnost tohoto postupu.

Nižší hodnota celkové návratnosti a návratnosti myelomových buněk ve dvoukrokových procedurách odpovídá vyššímu počtu centrifugačních kroků.

Dosažené hodnoty čistoty frakce myelomových buněk dle hodnocených znaků je možno zvyšovat zavedením dalších kroků. Jde o mírné přetížení kapacity kolony u pozitivní selekce (princip kompetice), užití flow rezistoru o vyšším průtoku, zvýšení objemů promývacích pufrů, „back flush“ metoda

Obr. č. 1 a 2: Cytospinové preparáty z pokusu č. 8 (jedнокroková procedura), barvení May-Grünwald-Giemsa, zvětšení 1000 x.

Foto č. 1: Mononukleární buňky kostní dřeně. Foto č. 2: Buňky frakce CD138+.



Tabulka č. 2: Flowcytometrické hodnocení čistoty.

CD znaky v % (medián, rozpětí, hodnoceno z dostupných dat provedených pokusů), TCR (Target cell recovery-návratnost myelomových buněk v %), fE (index obohacení). * vyšetření provedeno pouze v jednom pokusu.

FLOWCYTPMETRIE		CD54	CD138	CD38/45/54	CD38/45/56	CD38/45/138
1 KROK	VSTUP (BMMC)	24,1 (7,8–40,3)	37,3 (12,6–61,9)	16,0 (5,36–31,2)	30,3 (5,3–38,3)	15,7 (3,0–25,4)
	FRAKCE CD138+	49,1 (25,7–72,5)	78,9 (74,9–87,4)	49,4 (34,0–73,8)	57,8 (42,5–76,9)	68,4 (53,1–87,2)
	FRAKCE CD138–	6,8 (3,7–9,8)	6,6 (2,0–11,1)	4,4 (0,8–8,0)	5,0 (0,9–9,1)	1,2 (0,9–8,6)
	TCR (%)	69,9 (58,5–81,3)	54,7 (11,1–128,9)	135,2 (107,0–163,5)	144,8 (90,8–192,8)	152,2 (102,1–199,6)
	fE	4,0 (3,9–4,1)	25,9 (1,84–25,9)	6,2 (6,2–17,2)	5,4 (5,4–24,4)	18,5 (3,3–31,8)
2 KROKY	VSTUP (BMMC)	22,9 (7,8–55,6)	30,4 (9,1–68,3)	16,7 (5,4–45,8)	18,6 (5,3–38,3)	12,0 (2,7–44,8)
	FRAKCE CD45+	*23,1	60,8 (60,8–66,8)	8,5 (2,7–14,2)	9,8 (2,7–16,9)	2,6 (2,5–14,2)
	FRAKCE CD45–	41,6 (15,4–67,8)	16,2 (4,7–72,9)	33,8 (14,3–53,2)	38,7 (15,6–61,7)	16,7 (2,97–54,7)
	FRAKCE CD45–138+	90,4 (67,5–98,1)	84,3 (74,8–94,5)	81,7 (64,2–93,9)	80,4 (66,7–94,8)	64,2 (40,9–91,4)
	FRAKCE CD45–138–	8,0 (1,3–14,6)	9,63 (0,9–65,2)	5,2 (1,2–9,2)	6,0 (1,9–10,2)	2,4 (0,4–9,5)
	TCR (%)	57,3 (44,7–144,6)	41,1 (10,5–92,2)	81,7 (48,4–194,6)	77,2 (48,7–209,5)	79,5 (38,8–180,9)
	fE	30,0 (17,4–76,5)	15,8 (1,4–148,6)	31,6 (6,9–43,4)	32,5 (6,4–44,0)	24,0 (2,5–55,1)

Tabulka č. 3: Korelace morfoloického a flowcytometrického hodnocení čistoty. Výsledky udány v %.

Pokus/Frakce	Morfoloicky	ČISTOTA		
		Flowcytometricky		
Pokus č. 7 (2 kroky)	Nátěr	CD38	Cd138	CD38/45/138
Vstup	11,6	18,6	10,4	2,7
Frakce CD45+	8,0	18,5	14,2	2,5
Frakce CD45–	22,0	10,7	4,7	3,0
Frakce CD45– 138+	100,0	64,2	78,0	60,8
Frakce CD45– 138–	pod 5,0	4,8	0,9	0,4
Pokus č. 8 (1 krok)	Cytospin	CD38	CD138	CD38/45/138
Vstup	36,9	17,1	3,5	3,0
Frakce CD138+	99,6	96,1	87,4	87,2
Frakce CD138–	28,3	24,6	2,0	1,5

event. její opakování, aplikace pozitivní frakce do nové kolony, užití blokátoru Fc receptorů. Pokusy o zvyšování čistoty pozitivní frakce mohou být provázeny ztrátami myelomových buněk. Proto je třeba zvážit požadavek na čistotu a množství buněk pro účely daného pokusu individuálně.

Využití takto získaných vitálních buněčných suspenzí by mohlo být následující:

Stanovení telomerázové aktivity. Byla prokázána velmi silná korelace mezi aktivitou telomerázy a malignitou. Telomerázová aktivita je detekována v 90% lidských rakovinných onemocnění [17] včetně mnohočetného myelomu [13].

Byl prokázán prognostický význam chromosomálních aberací umnohočetného myelomu [19]. Jejich záchyt by mohl být úspěšnější na vysoce čisté suspenzi myelomových buněk, kde detekovaná změna se týká s velkou pravděpodobností právě buňky myelomové. U subpopulace převážně zralých myelomových buněk, které mají podstatně nižší labelling index než primitivní plazmocelulární buňky [14] by nemusel být zisk metafázových chromosomů dostatečný k hodnocení pomocí techniky G-pruhování a nemusel by umožňovat FISH s využitím celochromosomových sond, nicméně diagnostika na interfázových jádrech s využitím sond pro jedinečné genové kopie poskytuje určité spektrum možností s cílenou detekcí změn v určitých oblastech genomu.

Selekce subpopulace primitivních plazmocelulárních buněk, které jsou vhodným zdrojem k založení primokultury a k získání metafázových chromosomů, by mohla rozšířit spektrum diagnostikovatelných změn. Umožnila by vyšetření G-technikou a FISH s využitím celochromosomových sond eventuálně novějších modifikací, které umožňují v jednom hybridizačním kroku vyšetření všech chromosomů (mFISH-multicolor fluorescence in situ hybridization). Zbývá dorešit způsob selekce těchto buněk.

Založení primokultury z vyseparovaných subpopulací umožňuje určení modifikovaného labelling indexu plazmatických buněk. Jeho srovnání se standardním postupem [16] může být předmětem výzkumu.

Isolace DNA z vyselektované frakce myelomových buněk umožňuje molekulárně genetickou analýzu a archivaci materiálu pro následná vyšetření v budoucnu.

Řada imunoterapeutických protokolů nové generace zaměřených na specifickou protinádorovou terapii pracuje s nádorem asociovanými antigeny (TAA –tumor associated antigens)[24], které jsou prostřednictvím antigen prezentujících buněk téhož pacienta předkládány autologním T lymfocytům. Buněčná suspenze myelomových buněk o vysoké čistotě získaná MACS separací může být jedním z vhodných zdrojů TAA využitelných v protokolech zaměřených na specifickou protinádorovou terapii třebaže pravý antigen zůstává neznámý.

Závěr:

Pomocí imunomagnetické separace jsme ze vzorku kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem připravili buněčnou suspenzi o vysokém zastoupení vitálních myelomových buněk s širokou využitelností v experimentální oblasti. S přihlédnutím k výsledkům a ekonomické náročnosti obou procedur se jeví jednokroková procedura dostačující pro naše další postupy.

Práce je podpořena granty: IGA MZ ČR 6152-3, GAČR 301/00/0405, IGF FNB 4/99, MŠMT UZ J07/98-141 100003, MŠMT J07/98-6700008 a výzkumným záměrem MZ ČR č. 000 65 2697 05.

Práce byla prezentována na XIV. Olomouckých hematologických dnech 8. 6. 2000. Magnetická separace myelomových buněk. Magnetic separation of myeloma cells.

Literatura:

1. Adam, Z., Klabusay, M., Vorlíček, J.: Imunofenotyp buněk mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. 1997, 10 (6): 174-179.
2. Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., Lose, E. J.: Biology of the Syndecans: A family of Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annual Reviews Cell Biology*. 1992, 8: 365-393.
3. Borsset, M., Helseth, E., Naume, B., Waage, A.: Lack of IL-1 secretion from human myeloma cells highly purified by immunomagnetic separation. *British Journal of Haematology*. 1993, 85: 446-451.
4. Couchman, J. R., Woods, A.: Syndecans, Signaling, and Cell Adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996, 61: 578-584.
5. Drach, J., Schuster, J., Nowotny, H., Angerler, J., Rosenthal, F., Fiegl, M., Rothermundt, Ch., Gsur, A., Jäger, U., Heinz, R., Lechner, K., Ludwig, H., Huber, H.: Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer research*. 1995, 55: 3854-3859.
6. Hájek, R., Vášová, I., Adam, Z., Mayer, J.: New approaches to management of multiple myeloma. *Acta Medica Austriaca*. 1996, 23: 91-98.
7. Harada, H., Kawano, M. M., Huang, N., Harada, Y., Iwato, K., Tanabe, O., Tanaka, H., Sakai, A., Asakura, H., Kuramoto, A.: Phenotypic Difference of Normal Plasma Cells From Mature Myeloma Cells. *Blood*. 1993, 81 (10): 2658-2663.
8. Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, Ch., Harsousseau, J. L., Grosbois, B., Bataille, R.: Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood*. 1999, 94 (8): 2583-2589.
9. Kawano, M., Huang, N., Harada, A., Harada, Y., Sakai, A., Tanaka, H., Iwato, K., Kuramoto, A.: Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. 1993. *Blood*, 82, 564-570.
10. Kawano, M. M., Huang, N., Tanaka, H., Ishikawa, H., Sakai, A., Tanabe, O., Nobuyoshi, M., Kuramoto, A.: Homotypic cell aggregation of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. *British Journal of Haematology*. 1991, 79: 583-588.
11. Kelly, T., Korset, M., Abe, E., Gaddy-Kurten, D., Sanderson, R. D.: Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leukemia and Lymphoma*. 2000, 37 (3-4): 273-281.
12. Klabusay, M., Doubek, M., Adam, Z., Hájek, R.: Sledování zbytkové choroby nemocných s mnohočetným myelomem průtokovou cytometrií. In Adam, Z., Hájek, R., Mayer, J., Ščudla, V., Vorlíček, J.: *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. 1. vyd., Brno, Masarykova univerzita, 1999, 372 s.
13. Nilsson, P., Mehle, C., Remes, K., Roos, G.: Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene*. 1994, 9 (10): 3043-3048.
14. Pope, B., Brown, R. D., Gibson, J., Petersen, A., Wiley, J., Joshua, D. E.: The Functional Phenotype of the Primitive Plasma Cell in Patients With Multiple Myeloma Correlates With the Clinical State. *Leukemia and Lymphoma*. 1997, 27: 83-91.
15. Pope, B., Brown, R., Gibson, J., Joshua, D.: The Bone Marrow Plasma Cell Labeling Index by Flow Cytometry. *Cytometry*. 1999, 38: 286-292.
16. Rawstron, A., Barrans, S., Blythe, D., Davies, F., English, A., Pratt, G., Child, A., Morgan, G., Jack, A.: Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *British Journal of Haematology*. 1999, 104: 138-143.
17. Shay, J. W., Bacchetti, S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*. 1997, 33 (5): 787-791.
18. Schneider, U., van Lessen, A., Huhn, D., Serke, S.: Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *British Journal of Haematology*. 1997, 97: 56-64.
19. Ščudla, V., Bačovský, J.: Prognostické faktory. In Adam, Z., Hájek, R., Mayer, J., Ščudla, V., Vorlíček, J.: *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. 1. vyd., Brno, Masarykova univerzita, 1999, 372 s.
20. Tai, Y. T., Teoh, G., Shima, Y., Chauhan, D., Treon, S. P., Raje, N., Hideshima, T., Davies, F. E., Anderson, C. K.: Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched populations. *Journal of immunological methods*. 2000, 235: 11-19.
21. Toušková, M., Maisnar, V., Krejsek, J., Kopecký, O.: Průkaz buněk mnohočetného myelomu vícebarevnou imunofluorescencí s vyhodnocením průtokovou cytometrií. *Vnitřní lékařství*. 1999, 45 (12): 708-712.
22. Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clement, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., Dore, J. M.: Aplasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology*. 1996, 94: 318-323.
23. Witzig, T. E., Kimlinger, T., Stenson, M., Therneau, T.: Syndecan-1 Expression on Malignant Cells from the Blood and Marrow of Patients with Plasma Cell Proliferative Disorders and B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 1998, 31: 167-175.
24. Yang, S., Darrow, T. L., Vervaert, C. E., Seigler, H. F.: Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow. *Cellular Immunol*. 1997, 179: 84-95.

knihy

COLORECTAL CANCER

C.S. McArdle, D. J. Kerr, P. Boyle (Eds.)

Isis Medical Media Ltd., Oxford 2000

220 str., 56 obr., 51 tab., ISBN 1 899066 72 1, cena 59,95 GBP

Monografie s mezinárodní autorskou účastí zpracovává problematiku kolorektálního karcinomu ve 12 kapitolách. Úvodní pojednání hodnotí celosvětovou incidenci – kolorektální ca se stal třetím nejčastějším maligním onemocněním. Vysoký výskyt je zaznamenán v ekonomicky rozvinutých zemích (USA, Kanada a také ČR), naopak je nejnižší v rozvojových zemích (Indie, Alžírsko). Jsou formulovány léčebné a preventivní postupy, jež by měly redukovat jednak počty nemocných, jednak zajistit jejich včasnou a správnou léčbu. V druhé kapitole o zobrazování a stagingu se konstatuje, že nejužívanějším vyšetřením je CT zaměřené na primární nádor, na uzliny a na metastázy v játrech. Ve třetí kapitole vyhrazené patologii kolorektálního ca a premaligních lézí jsou podrobně popsány polypózní syndromy. Kolorektální karcinom je považován za genetickou poruchu; vysoké riziko je zvláště u syndromů s adenomy (4. kap.).

V páté kapitole je pojednáno o screeningu (digitální vyšetření rekta, testy na okultní krvácení, sigmoideoskopie, irigoskopie a kolonoskopie), jehož cílem je snížit morbiditu i mortalitu časnější detekcí karcinomu nebo rizikových prekancerózních lézí. Výsledky screeningu jsou velmi povzbudivé. Chemoprevence kolorektálního karcinomu je tematem 6. kapitoly. V 7. kap. o chirurgii kolorektálního karcinomu se diskutují všeobecné principy i specifické postupy, stručně je

zmíněna i paliativní chirurgie. Poukázáno je i na možnosti stentování endoprotézou u stenozujících procesů. 8. kap. je zaměřena na kolorektální karcinom, který se rozptýlil do jater. Zhodnocení parenchymu jater s posouzením případných metastáz je vyhrazeno zobrazovacím metodám; svým specifickým způsobem jsou využívány UZ, CT i MRI. Z biochemických testů se nejvíce používá CEA. Dále jsou formulovány zásady terapie (resekce jater do počtu tří metastáz, dostatečný lem neporušeného parenchymu okolo metastázy, ztráta tkáně nepřesahující 25 %, žádné extrahepatické postižení). Je popsána adjuvantní léčba – kryoterapie, podání etanolu, regionální chemoterapie a embolizace. Celou šíři terapeutických zásahů může nabídnout jen specializované centrum. Kolorektálnímu karcinomu, který přichází do nemocnice jako akutní stav, je věnována 9. kapitola. Akutní stav představuje obstrukce střeva, perforace nebo krvácení. Nepříznivě se uplatňuje komorbidita s patologickými stavy srdce, plic nebo CNS. Radiační léčba se uplatňuje hlavně u ca rekta. Kombinace s chemoterapií se využívá hlavně naopak u colon. Předposlední kapitola se zabývá systémovou chemoterapií (hlavním preparátem jsou sloučeniny fluorouracilu). Poslední kapitola se vrací znovu k obstrukčním formám ca.

Výtečná monografie vybavená barevnými snímky a ilustracemi (formát 276 x 189 mm) analyzuje problematiku kolorektálního karcinomu ze všech úhlů. Přináší aktuální informace, které využijí onkologové, gastroenterologové, chirurgové a radiologové. Knihu distribuje Plymbridge Distributors Limited, Estover Road, Plymouth PL6 7PY, UK.

V. R., V. H.