

SROVNÁNÍ SELEKCE PLAZMATICKÝCH BUNĚK METODAMI MACS A FACS

ISOLATION OF PLASMA CELLS USING MACS AND FACS – RESULTS

BUREŠOVÁ I.^{1,2}, ČUMOVÁ J.^{1,2}, KOVÁŘOVÁ L.², KYJOVSKÁ D.^{1,2}, VIDLÁKOVÁ P.^{1,2}, SUSKÁ R.², PERUTKA T.¹, MORAVCOVÁ J.¹, RYCOVÁ M.¹, PENKA M.², HÁJEK R.^{1,2,3}

¹ UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM-ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

³ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

Souhrn

V této studii jsme srovnali dvě metodiky separace plazmatických buněk z kostní dřeně dostupné v současné době na našem pracovišti. Práce srovnává úspěšnost obou metodik v závislosti na vstupní infiltraci a hodnotí i další aspekty separace buněk, jako je finanční a časová náročnost.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom, Separace, MACS, FACS, CD138+.

Summary

We have compared two different methods used for the isolation of plasma cells from the bone marrow. Our analysis focuses on the efficacy of either method for different plasma cell percentages in the bone marrow as well and on financial and time requirements.

Keywords: Multiple myeloma, Separation, MACS, FACS, CD138+.

Úvod

Vysoká čistota plazmatických buněk je základním předpokladem pro uplatnění cytogenetických, molekulárně biologických a proteomických aplikací ve výzkumu mnohočetného myelomu (MM) a monoklonálních gamapatií nejasného významu. Zatímco technika magnetické selekce byla na našem pracovišti zavedena již dříve (3), nově máme k dispozici také techniku fluorescenčního třídění buněk (viz Metodická část), která je pro selekci plazmatických buněk z kostní dřeně také využívána (7,4). Rozhodli jsme se provést srovnání obou metodik, abychom prověřili jejich možnosti a limity v reálné praxi, tedy na vzorcích odebraných od pacientů s MM. Současně měla tato studie posloužit k optimalizaci metodiky přípravy buněk pro fluorescenční třídění.

Soubor nemocných

Bylo zpracováno paralelně celkem 20 vzorků kostní dřeně od 6 pacientů s MGUS a 14 pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem (3 x stadium I, 1 x stadium 2 a 10 x stadium III). Jednalo se o 9 mužů a 11 žen s mediánem věku 67,5 let, v rozmezí od 53 do 85 let. Jedenáct pacientů mělo isotyp IgG.

Metodiky

Heparinizované vzorky kostní dřeně byly odebrány do Iscova média (IMDM, Sigma, No: I-2510) s přidavkem DNázy (Roche, No: 1284932). Vzorek byl důkladně promíchán a bylo odděleno 10 ml pro zpracování na sorteru (FACS Aria, BD Biosciences). Zbytek KD byl zpracován

cestou imunomagnetické separace MACS. Mononukleární buňky kostní dřeně (MNKD) byly získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque- 1077 (Sigma, No: H-8809, centrifugace 400g, 35 min, 4 °C). Po dvojím promytí v PBS + 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min, 4 °C) bylo provedeno magnetické značení protilátkou CD138 MicroBeads (Miltenyi, No: 130-051-301) v dávce 20 µl s 80 µl pufru (PBS+ 2mM EDTA+ 0,5% lidský albumin)/ 10⁷ buněk. Vlastní separace plazmatických buněk byla provedena na automatickém separátoru AutoMACSTM s využitím programu possels (viz. metodická část).

Vzorek pro sorter FACS Aria byl rozdělen na dvě části. Z jedné části byly izolovány mononukleární buňky kostní dřeně denzitní gradientovou centrifugací (postup zpracování viz. výše). Druhá část KD byla lyzována roztokem NH₄Cl (8,3 g/1000 ml H₂O). V obou frakcích byla stanovena buněčnost (Bürkerova komůrka), aby mohlo být určeno množství protilátky CD138, potřebné k označení buněk. Na několika vzorcích s vyšší buněčností byla odzkoušena spotřeba protilátky – jako dostačující množství bylo stanoveno 8 µl protilátky (anti CD138 firmy BD Biosciences)/ 10⁶ buněk. Při nižším množství bylo obarvení nedostatečné a byla špatně oddělena negativní a pozitivní populace. Při vyšším množství docházelo k nespecifické vazbě protilátky se stejným výsledkem. Inkubace probíhala při 4°C minimálně 30 minut.

Po inkubaci s protilátkou byl vzorek promyt studeným PBS a naředěn na koncentraci 5 -10 x 10⁶/ml studeným roztokem PBS + 1% telecího fetálního albuminu (BoFeS - Sigma, No: F-2442).

příklad

Vlastní třídění buněk probíhalo obvykle při rychlosti 3-8 x 10³/s; při této rychlosti byla účinnost třídění v rozmezí 90 – 95%. Buňky byly tříděny do vrstvy RPMI 1460 média (Sigma, No: R-8758) + 10% BoFeS a ihned po ukončení třídění byly stočeny a doplněny čerstvým čistým médiem. Byla sbírána jak tzv. pozitivní frakce (CD138+), tak negativní frakce (CD138-, ostatní buňky). Čistota těchto frakcí byla vyhodnocena morfologicky (cytopspin a prohlédnutí po panoptickém nabarvení) jako % plazmatických buněk. Výsledky byly zhodnoceny statisticky (neparametrický Kruskal-Wallis ANOVA test a Mann-Whitney test).

Výsledky

Mediány čistoty pozitivních frakcí všech vzorků byly 74,8% (8,6% – 98,8%) pro magneticky separované buňky, 97,6% (50,0% – 100,0%) pro tříděné lyzované buňky a 99,2% (83,3% – 100,0%) pro tříděné buňky připravené gradientovou centrifugací. Jak je vidět z rozmezí minimálních a maximálních hodnot, rozdíly v rámci jedné metodiky byly až 90%, proto bylo hodnocení provedeno odděleně ve třech skupinách vzorků podle % CD138+ buněk, stanoveného na průtokovém cytometru bezprostředně před selekcí: u první skupiny byla vstupní infiltrace do 5% (skupina I – 9 vzorků), u druhé v rozmezí 5 až 10% (skupina II – 5 vzorků) a u třetí nad 10% (skupina III – 7 vzorků). Mediány čistoty pozitivních frakcí magneticky separovaných buněk vykazovaly vzestup v závislosti na vstupní infiltraci: od 64,8% (skupina I) po 97,3% (skupina III); u fluorescenčně tříděných buněk tento trend pozorován nebyl (viz Tabulka č.1, Graf č.1). Při statistickém zhodnocení jednotlivých metodik u všech vzorků byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi čistotami pozitivních frakcí ($p=0,003$), a to mezi magnetickou selekcí a fluorescenčně tříděnými buňkami, jak lyzovanými ($p = 0,044$), tak připravenými gradientovou centrifugací ($p<0,001$). Mezi různě připravenými

fluorescenčně tříděnými buňkami rozdíl nalezen nebyl ($p=0,119$). V rámci jednotlivých skupin byly statisticky významné rozdíly zachovány jen ve skupině I (do 5% CD138+ buněk); v ostatních skupinách statisticky významné rozdíly nalezeny nebyly.

Čistota negativních frakcí byla posuzována podle procenta reziduálních plazmatických buněk: při hodnocení všech vzorků byl medián čistoty 2,4% (0,2% – 25,0%) pro magneticky separované buňky, 0,5% (0,0% – 3,2%) pro tříděné lyzované buňky a 1,2% (0,0% – 4,0%) pro tříděné buňky připravené gradientovou centrifugací. Při statistickém zhodnocení jednotlivých metodik u všech vzorků byl mezi čistotami negativních frakcí nalezen statisticky významný rozdíl ($p=0,002$), a to mezi lyzovanými fluorescenčně tříděnými buňkami a magneticky separovanými buňkami ($p<0,001$) a mezi lyzovanými tříděnými buňkami a buňkami tříděnými po gradientové centrifugaci ($p=0,007$). Stejně jako u pozitivních frakcí byly statisticky významné rozdíly zachovány jen ve skupině I (do 5% CD138+ buněk).

Diskuse

V naší práci jsme srovnávali různé metody selekce plazmatických buněk, a to především z hlediska čistoty separované populace. Zajímaly nás také ztráty buněk během selekce (zastoupení myelomových buněk v negativní frakci), náklady na jednotlivé metodiky a časová náročnost. Z našich výsledků je zřejmé, že úspěšnost magnetické selekce, posuzovaná podle čistoty získaných myelomových buněk, je ve srovnání s fluorescenčním tříděním více závislá na zastoupení plazmatických buněk ve vstupním materiálu (viz Graf č.1).

Hodnota vstupní infiltrace 5% CD138+ buněk byla v naší práci vyhodnocena jako cut-off hodnota, nad kterou jsou všechny metodiky schopny poskytnout srovnatelné výsledky. Určitá závislost na vstupní infiltraci se ale projevuje napříč všemi metodikami. Se stoupající vstupní infiltrací se zužuje interval mezi minimálními a maximálními

	Magnetická selekce	Fluoresc. třídění lyzovaných buněk	Fluoresc. třídění buněk po gradient. centrifugaci
Všechny vzorky	74,8 (8,6 - 98,8)	97,6 (50,0 - 100,0)	99,2 (83,3 - 100,0)
Skupina I	64,8 (8,6 - 89,3)	96,4 (50,0 - 100,0)	99,5 (83,3 - 100,0)
Skupina II	79,8 (61,6 - 98,0)	77,6 (69,2 - 92,1)	96,9 (92,8 - 100,0)
Skupina III	97,3 (61,1 - 98,8)	99,5 (98,8 - 99,6)	99,2 (94,5 - 100,0)

Tabulka č. 1: Čistota pozitivních frakcí stanovená morfologicky – medián % plazmatických buněk (min-max)

Skupina I – vzorky se vstupní infiltrací do 5% CD138+ bb, Skupina II – vzorky se vstupní infiltrací 5 - 10% CD138+ bb, Skupina III – vzorky se vstupní infiltrací nad 10% CD138+ bb

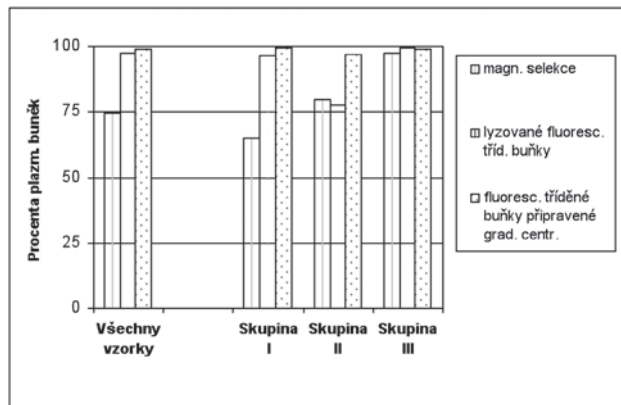
	Magnetická selekce	Fluoresc. třídění lyzovaných buněk	Fluoresc. třídění buněk po gradient. centrifugaci
Všechny vzorky	2,4 (0,2 - 25,0)	0,5 (0,0 - 3,2)	1,2 (0,0 - 4,0)
Skupina I	1,2 (0,0 - 0,8)	0,4 (0,0 - 0,8)	1,2 (0,0 - 2,0)
Skupina II	1,8 (0,2 - 2,8)	0,4 (0,0 - 4,0)	1,1 (0,0 - 4,0)
Skupina III	0,6 (0,2 - 15,0)	0,8 (0,0 - 3,2)	3,2 (0,8 - 4,0)

Tabulka č. 2: Čistota negativních frakcí stanovená morfologicky – medián % plazmatických buněk (min-max)

Skupina I – vzorky se vstupní infiltrací do 5% CD138+ bb, Skupina II – vzorky se vstupní infiltrací 5 - 10% CD138+ bb, Skupina III – vzorky se vstupní infiltrací nad 10% CD138+ bb

hodnotami čistoty, dosažené v rámci výše uvedených skupin. Vyšší vstupní infiltrace tak vždy přinese vyšší jistotu úspěšného výsledku, ale na druhou stranu poroste možnost úniku plazmatických buněk do negativní frakce (viz Tabulka č.2).

Vzhledem k tomu, že existuje velká skupina vzorků, které je možno zpracovat všemi testovanými metodami se statisticky stejným výsledkem, je nutné zvažovat i další parametry, jako je cenová a časová náročnost.



Graf č. 1: Mediány čistot pozitivních frakcí stanovené morfologicky (% plazmatických buněk)

Skupina I – vzorky se vstupní infiltrací do 5% CD138+ bb

Skupina II – vzorky se vstupní infiltrací 5 - 10% CD138+ bb

Skupina III – vzorky se vstupní infiltrací nad 10% CD138+ bb

Náklady na zpracování kostní dřeně před a po selekci jsou velmi podobné, řádově jde o náklady asi 1000 Kč na jednu dřeň. Zásadní rozdíl je v ceně značení vzorku před selekcí. U obou metodik se nákladnost značení bude odvíjet od počtu zpracovávaných buněk, který bývá velmi individuální; v našem souboru 20 srovnávaných vzorků byl medián počtu zpracovávaných buněk 37×10^6 (5×10^6 - 225×10^6). Náklady na zpracování 37×10^6 buněk magnetickou selekcí byly 740 Kč + 50 Kč na separační kolony; pro fluorescenční vytřídění stejného množství buněk bylo potřeba protilátky za 2747 Kč. Tyto náklady se ale dají redukovat – v současné době pracujeme s protilátkou jiné firmy, se

kteřou by tyto náklady byly 1013 Kč, čili z 2,5 násobku ceny jsme schopni se dostat na 1,3 násobek.

Jednoznačnou obrovskou výhodou magnetické selekce proti fluorescenčnímu třídění je její časová nenáročnost. Když pomineme fázi přípravy a zpracování separovaných buněk, která bude přibližně stejná pro všechny metody a bude představovat asi 2,5 – 3 hod, vlastní selekce je v případě MACS otázkou asi 10 minut včetně promytí přístroje, bez ohledu na počet zpracovávaných buněk. Fluorescenční třídění je časově nesrovnatelně náročnější a bude vždy záviset na počtu buněk. Při nízkých infilracích můžeme pracovat s rychlostí do 5×10^3 buněk/s (pokud chceme dosáhnout vysoké čistoty bez větších ztrát buněk) čili zpracování 37×10^6 buněk by zabralo asi 2 hod. Při vysoce buněčných vzorcích se ovšem můžeme dostat na časy až 12 hod.

Prodloužená doba separace může mít zásadní dopad na sledování hladiny genů či proteinů. Na rozdíl od genomu je exprese RNA vysoce dynamická a rychle se mění v odpovědi na odchylky prostředí či během normálních buněčných procesů jako jsou replikace nebo dělení buňky (8,5). Bylo prokázáno, že zpožděná izolace mononukleárních buněk z plně periferní krve o tři hodiny vede k významným systematickým změnám v genové expresi (1,6). Také skladování vede ke změnám v aktivitě genů závislé na buněčném typu. Pro expresní studie je nutné snížit čas nezbytný do izolace RNA (2)

Závěr

V rámci provedené studie se podařilo optimalizovat dva použitelné postupy zpracování kostní dřeně před tříděním a zvládnout vlastní metodiku třídění a práci s náročným přístrojem. Získané zkušenosti budou využity pro rozhodování o využití konkrétních metodik v konkrétních případech. Fluorescenční třídění plazmatických buněk se zdá být dobrým příslibem pro zpracování vzorků kostní dřeně s nízkou vstupní infiltrací.

Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

Literatura

- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 2004; 5(5):347-53.
- Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(3):193-207.
- Fiserova A, Hajek R, Holubova V et al. Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma* 2002; 49:300-306.
- Franke S, Hensen K, Peeters V et al. FISH, PCR and CGH, on FACS sorted plasma cells in MM and MGUS. *Haematologica* 2007; 92(suppl.2): abstract n.PO-102.
- Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell.* 1998; 2(1):65-73.
- Radich JP, Mao M, Stepaniants S et al. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics.* 2004; 83(6):980-8.
- Rasillo A, Tabernero MD, Sánchez ML et al. Fluorescence In Situ Hybridization Analysis of Aneuploidization Patterns in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance versus Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia. *Cancer* 2003; 97:601-9.
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(12):3273-97.