

Algoritmus separace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně

Plasma Cell Separation Algorithm from Bone Marrow Samples

Burešová I.¹, Kyjovská D.^{1,2}, Kovářová L.², Moravcová J.¹, Suská R.², Perutka T.¹, Čumová J.¹, Hájek R.^{1,2,3}

¹Babákův výzkumný institut, LF MU Brno

²Oddělení klinické hematologie, Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, FN Brno

³Interní hematologická klinika FN Brno

Souhrn

Východiska: Cílem této práce je představit algoritmus separace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem. Získání vysoce čistých buněčných populací je základní podmínkou aplikace moderních výzkumných postupů u tohoto onemocnění. **Materiál a metody:** Vzorky kostní dřeně byly získány od pacientů z Interní hematologické kliniky FN Brno. Kostní dřeň byla nejprve zbavena červené složky (metodou hustotní gradientové centrifugace nebo lyzace), plazmatické buňky byly označeny monoklonální protilátkou proti syndecanu-1 (CD138) a separovány magneticky nebo na buněčném sorteru. Čistota separované populace byla vyhodnocena na průtokovém cytometru, případně morfologicky. **Výsledky:** Paralelně, magnetickou a fluorescenční separací, bylo zpracováno 28 vzorků kostní dřeně a byla vyhodnocena čistota separovaných frakcí. Na základě statistického hodnocení výsledných čistot jak v celém souboru vzorků, tak ve skupinách podle vstupního zastoupení plazmatických buněk byl navržen algoritmus separace s cut-off hodnotou 5 % plazmatických buněk v mononukleární frakci KD: vzorky s < 5 % plazmatických buněk jsou nadále tříděny na buněčném sorteru, vzorky s ≥ 5 % plazmatických buněk jsou separovány na magnetickém separátoru. Po ročním vyhodnocení uplatnění tohoto algoritmu na souboru 210 vzorků kostní dřeně se medián čistoty separovaných plazmatických buněk zvedl z 62,4 % (0,4–99,6 %) na 94,0 % (23,9–100 %). **Závěr:** Zavedení metodiky fluorescenčního třídění výrazně přispělo k celkovému zvýšení úspěšnosti separace plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně, a to především u vzorků s jejich nízkým vstupním zastoupením, kde dosud využívaná metodika magnetické separace není dostatečně účinná. Otevřela se tím také cesta k separaci plazmatických buněk ze vzorků kostní dřeně od jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu, kde je zastoupení plazmatických buněk typicky velmi nízké (desetiny, max. jednotky procent).

Klíčová slova

mnohočetný myelom – plazmatická buňka – monoklonální gamapatie nejasného významu – magnetická separace – buněčný sorter

Práce byla podpořena granty MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA NS10406, IGA NS10408, GAČR P304/10/1395.

This work was supported by grants MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA NS10406, IGA NS10408, GAČR P304/10/1395.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.
Babákův výzkumný institut
Lékařská fakulta MU
Kamenice 5/pavilon A3
625 00 Brno
e-mail: r.hajek@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 26. 4. 2010
Přijato/Accepted: 24. 6. 2010

Summary

Backgrounds: The aim of this paper is to present an algorithm for plasma cell separation from bone marrow samples of multiple myeloma patients. The main prerequisite for applying modern research methods in this disease is gaining pure cell populations. **Material and Methods:** Bone marrow samples were collected from outpatients or inpatients of the Internal Haematology and Oncology Clinic of the Faculty Hospital Brno, after they had signed an Informed Consent Form. The bone marrow was first depleted of red cells (by density gradient centrifugation or erythrolysis), plasma cells were labelled by monoclonal antibody against syndecan-1 (CD138) and separated either magnetically or by cell sorter. The purity of separated population was evaluated by flow cytometry or, alternatively, morphologically. **Results:** We processed 28 bone marrow samples, in parallel, by magnetic or fluorescence-based separation, and we evaluated the purity of the separated fractions. Based on a statistical evaluation of resulting purities in the entire sample set as well as the individual groups divided according to the initial plasma cell content, a separation algorithm was proposed with a cut-off value of 5% of plasma cells in mononuclear fraction of bone marrow: samples with less than 5% of plasma cells are henceforth separated on cell sorter, samples with more than 5% are separated magnetically. The effectiveness of this algorithm was evaluated after the first year of its application on a dataset of 210 bone marrow samples: median purity of the separated plasma cells increased from 62.4% (0.4–99.6%) to 94.0% (23.9–100%). **Conclusion:** The introduction of a fluorescence-based separation markedly increased the effectiveness of plasma cell separation from bone marrow samples, mainly in samples with low plasma cell content where magnetic separation used thus far is not sufficient. This finding also opened a door for plasma cell separation of bone marrow samples from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, where plasma cell count is typically below or just over one percent.

Key words

multiple myeloma – plasma cell separation – monoclonal gammopathy of undetermined significance – magnetic separation – cell sorter

Východiska

Základní podmínkou aplikace moderních výzkumných postupů – cytogenetiky, genomiky, proteomiky nebo různých čipových technologií – ve výzkumu monoklonálních gamapatií (MG) je vysoká čistota zkoumané buněčné populace. V podmínkách našeho pracoviště jde především o plazmatické buňky (PB) z kostní dřeně. Typicky se jejich procentuální zastoupení v kostní dřeni pohybuje od velmi nízkých hodnot, pod 0,5% PB u jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) nebo v remisi mnohočetného myelomu (MM), po velmi vysoké, 50% a více u pacientů s agresivním onemocněním, což znesnadňuje výběr separační strategie.

Obecně se k separaci buněk využívá fenotypu cílových buněk a značení monoklonálními protilátkami konjugovanými

s detekčním prvkem – nejčastěji magnetickou partikulí nebo fluorochromem. Vlastní separace pak probíhá v příslušném detekčním systému (magnet nebo průtokový cytometr se sorterem) postupem pozitivní (detekční systém vybírá cílové buňky) nebo negativní selekce (systém zachycuje nežádoucí buňky).

K izolaci PB je již dlouhodobě a ve velkém rozsahu využívána imunomagnetická separace, a to jak ve formě negativní selekce, spočívající v odstranění jiných buněčných populací než PB [1–2], tak pozitivní, využívající především univerzálního znaku PB, syndecanu-1/CD138 [3–5]. Později, s dostupností nových vysokorychlostních sorterů, se začala využívat i technika fluorescenčního třídění [6]. Ze srovnání těchto postupů (tab. 1) je zřejmé, že každý z nich má své přednosti i nevýhody uplatnění v konkrétních podmínkách.

V naší laboratoři byla technika magnetické separace zavedena již před několika lety [7] a dále optimalizována v podmínkách automatizovaného provozu [8]. Koncem roku 2006 jsme získali vysokorychlostní buněčný sorter a začali testovat metodu fluorescenčního třídění PB. Tato práce představuje výsledky dosažené při srovnání obou separačních postupů, algoritmus separace PB vytvořený na jeho základě a jeho úspěšné ověření během ročního rutinního provozu.

Materiál a metody

Vzorky kostní dřeně (KD) byly odebrány pacientům z ambulance či oddělení Interní hematologické kliniky FN Brno s jejich informovaným souhlasem. Odebraná kostní dřeň (objem 20–40 ml) byla smíchána se stejným objemem IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma) s přidaným heparinem a DNázou

Tab. 1. Základní parametry magnetické a fluorescenční separace.

Magnetická separace	Fluorescenční separace
časově nenáročná	časově náročná
nižší vstupní náklady	vyšší vstupní náklady
separace dvou subpopulací (neg., poz.)	separace více různých subpopulací
separace podle jednoho znaku nebo více jednotně detekovaných znaků (pro neg. selekci)	separace podle více různě detekovaných znaků
závislá na síle exprese znaku	nezávislá na síle exprese znaku
optimální pro užší rozmezí infiltrace vstupního materiálu	nezávislá na infiltraci vstupního materiálu

Tab. 2. Čistota pozitivních frakcí – medián (min–max).

	Morfologické hodnocení (% plazmatických buněk)		
	Magn. sep. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC
všechny vzorky (n = 28)	80,4 (8,6–99,6)	97,4 (50,0–100,0)	98,2 (50,0–100,0)
skupina s infiltrací < 5 % (n = 10)	64,8 (8,6–89,3)	96,4 (50,0–100,0)	99,5 (83,3–100,0)
skupina s infiltrací 5–10 % (n = 6)	95,3 (61,6–98,0)	84,9 (69,2–97,4)	94,9 (92,0–100,0)
skupina s infiltrací > 10 % (n = 12)	96,0 (52,0–99,6)	99,4 (66,7–100,0)	98,5 (50–100,0)
	Cytometrické hodnocení (% CD138+ buněk)		
	Magn. sep. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC
všechny vzorky (n = 28)	74,0 (8,1–97,1)	95,4 (24,3–99,3)	96,9 (55,4–99,3)
skupina s infiltrací < 5 % (n = 10)	54,0 (8,1–73,9)	75,2 (24,3–96,3)	88,0 (71,2–98,0)
skupina s infiltrací 5–10 % (n = 6)	65,0 (38,7–93,5)	93,0 (50,0–96,3)	95,6 (87,7–97,9)
skupina s infiltrací > 10 % (n = 12)	83,6 (47,4–97,1)	98,2 (91,9–99,3)	98,6 (55,4–99,3)

(Roche Diagnostics) a tentýž den zpracována za účelem separace. Vzorek byl rozdělen na dva díly, které byly zpracovány paralelně jak metodou magnetické separace, tak na buněčném sorteru.

Červená složka KD byla odstraněna lyzací roztokem chloridu amonného (0,83% NH₄Cl) nebo denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque 1077 [7]. Zastoupení CD138+ buněk v mononukleární frakci (dále vstupní infiltrace) bylo stanoveno průtokovou cytometrií.

Magnetická separace mononukleární frakce (mononuclear cells – MNC) byla prováděna patentovanou technologií MACS (Miltenyi Biotec) na separátoru AutoMACS dle doporučení výrobce. Separace byla prováděna postupem pozitivní selekce pomocí protilátky namířené proti syndecanu-1 a konjugované s magnetickou kuličkou (CD138 Microbeads; Miltenyi Biotec). Pro separaci jsme používali program possels s pomalejším průchodem jednou kolonou.

Separace na buněčném sorteru byla provedena jednak po lyzaci, jednak po izolaci MNC (viz výše). MNC nebo lyzovaná

KD byly inkubovány (30 min, 4 °C) s fluorescenčně značenou protilátkou proti syndecanu-1 (CD138-PE, Beckman-Coulter nebo Exbio). Po promytí byly buňky resuspendovány studeným PBS a tříděny na vysokorychlostním buněčném sorteru FACSAria (BD Biosciences). Sorter pracoval s intermediárním nastavením čistoty proti výtěžku, ke třídění byly vybírány buňky se silnou expresí znaku CD138 a z třídění byly vyloučeny dublety negativních a pozitivních buněk. PB byly tříděny do zkumavek se 2 ml sběrného média (10% telecí fetální sérum v RPMI médiu).

Čistota pozitivní a negativní frakce byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie jako % CD38+ CD138+ nebo CD138+ buněk a podle možností i morfologicky (cyto-spin a prohlédnutí po panoptickém obarvení) jako % PB. Aby mohly být separované buňky využity pro další analýzy, bylo potřeba dosáhnout alespoň 70% zastoupení PB/CD138+ buněk v pozitivní frakci.

Vyhodnocení srovnání magnetické a fluorescenční separace bylo provedeno v souboru všech 28 vzorků, ale také

po rozdělení vzorků do třech skupin – podle vstupní infiltrace. V první skupině byly vzorky s infiltrací < 5 %, ve druhé s infiltrací 5–10 % a ve třetí s infiltrací > 10 %. Výsledky byly hodnoceny neparametrickým Kruskal-Wallis ANOVA testem a Mann-Whitney testem (na hladině významnosti 5 %).

Výsledky

Bylo zpracováno 28 vzorků kostní dřevě s mediánem vstupní infiltrace 9,3 % (0,8–67,2 %). Pozitivní frakce po magnetickém zpracování měla medián čistoty 80,4 % (8,6–99,6 %) při morfologickém a 74,0 % (8,1–97,1 %) při cytometrickém hodnocení. U tříděných lyzovaných buněk byla čistota pozitivní frakce 97,4 % (50,0–100,0 %) při morfologickém a 95,4 % (24,3–99,3 %) při cytometrickém hodnocení a u tříděné mononukleární frakce byly získány hodnoty 98,2 % (50,0–100,0 %) a 96,9 % (55,4–99,3 %). Čistoty pozitivních frakcí při rozdělení vzorků do skupin podle vstupní infiltrace jsou uvedeny v tab. 2. Rozdíly mezi čistotami pozi-

Tab. 3. Výsledky Kruskal-Wallis ANOVA testu (na hranici významnosti 5 %) při hodnocení rozdílů mezi jednotlivými metodami separace.

	Pozitivní frakce		Negativní frakce	
	Morfol.	Cyt.	Morfol.	Cyt.
všechny vzorky (n = 28)	0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001
skupina s infiltrací < 5 % (n = 10)	0,013	0,001	0,007	< 0,001
skupina s infiltrací 5–10 % (n = 6)	0,567	0,042	0,019	0,009
skupina s infiltrací > 10 % (n = 12)	0,104	< 0,001	0,010	< 0,001

Tab. 4. Úspěšnost (v %) dosažení alespoň 70% čistoty pozitivní frakce.

	Morfologicky hodnocené vzorky			Cytometricky hodnocené vzorky		
	Magn. separov. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC	Magn. separov. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC
všechny vzorky	65,0	82,4	94,7	53,8	76,9	96,2
skupina s infiltrací < 5 %	28,6	80,0	100,0	11,1	50,0	100,0
skupina s infiltrací 5–10 %	66,7	75,0	100,0	40,0	66,7	100,0
skupina s infiltrací > 10 %	81,8	87,5	90,0	91,7	100,0	91,7

tivních frakcí při různých způsobech zpracování byly statisticky významné ($p = 0,003$ při morfologickém a $p < 0,001$ při cytometrickém hodnocení). Po rozdělení vzorků do skupin podle vstupní infiltrace byl při morfologickém hodnocení statisticky významný rozdíl potvrzen jen ve skupině vzorků s infiltrací < 5 % ($p = 0,013$), při cytometrickém hodnocení se tento rozdíl projevil ve všech třech skupinách (tab. 3). Další statistická analýza prokázala statisticky významný rozdíl mezi čistotami pozitivních frakcí magneticky separovaných buněk a tříděných buněk, bez ohledu na způsob jejich přípravy před tříděním (nedokumentováno).

Analýzovali jsme závislost získané čistoty pozitivní frakce na vstupní infiltraci a zjistili jsme, že nemá charakter pozitivní korelace: hodnoty korelačních koeficientů mezi vstupní infiltrací a čistotou pozitivní frakce magneticky separovaných, tříděných lyzovaných a tříděných mononukleárních buněk byly 0,524, 0,170 a -0,399 při morfologickém a 0,524,

0,367 a -0,371 při cytometrickém hodnocení. Nicméně se stoupající vstupní infiltrací rostla úspěšnost dosažení požadované minimální 70% čistoty (tab. 4).

Negativní frakce po magnetickém zpracování měla medián zastoupení reziduálních PB/CD138+ buněk 2,4 % (0,2–38,0%) při morfologickém a 1,3 % (0,2–25,7%) při cytometrickém hodnocení. U tříděných lyzovaných buněk bylo nalezeno 0,4 % (0,0–3,2%) reziduálních PB/CD138+ buněk při morfologickém a 0,1 % (0,0–1,0%) při cytometrickém hodnocení. U tříděné mononukleární frakce byly získány hodnoty 1,6 % (0,0–4,0%) a 0,1 % (0,0–0,1%) reziduálních PB/CD138+ buněk. Výsledky čistoty negativních frakcí při rozdělení vzorků do skupin podle vstupní infiltrace jsou uvedeny v tab. 5. Rozdíly mezi čistotami negativních frakcí byly statisticky významné ($p < 0,001$ při morfologickém i cytometrickém hodnocení), a to jak v celém souboru vzorků, tak při jeho rozdělení do skupin (tab. 3). Další statistická analýza prokázala statisticky vý-

znamné rozdíly mezi všemi typy separace (nedokumentováno).

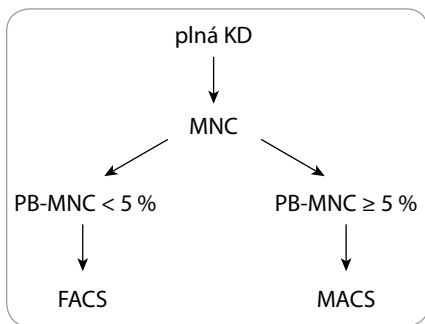
Na základě výše uvedených statistických analýz byl vytvořen algoritmus separace PB z KD, který jako rozhodovací parametr využívá 5% zastoupení PB v MNC (obr. 1). Podle uvedeného algoritmu separace bylo v období 12 měsíců (září 2008–září 2009) zpracováno celkem 210 odběrů KD s mediánem vstupní infiltrace 3,1 % (0,05–85,2%). Medián čistoty pozitivní frakce byl 94,0% (23,9–100%) oproti 62,4% (0,4–99,6%) z doby před zavedením algoritmu. Zlepšila se úspěšnost v dosažení vysoké čistoty vzorků: pro skupiny vzorků s infiltrací < 5 %, 5–10 % a > 10% byla úspěšnost dosažení alespoň 70% čistoty před zavedením algoritmu 28,6%, 66,7% a 81,8%, kdežto po zavedení algoritmu 95,5%, 85,3% a 84,7%.

Diskuze

Naším cílem je využívat co neefektivněji dostupnou přístrojovou techniku (magnetický separátor AutoMACS a vysokorychlostní sorter FACS Aria) pro separaci

Tab. 5. Čistota negativních frakcí – medián (min – max).

	Morfologické hodnocení (% plazmatických buněk)		
	Magn. sep. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC
všechny vzorky (n = 28)	2,4 (0,2–38,0)	0,4 (0,0–3,2)	1,6 (0,0–4,0)
skupina s infiltrací < 5 % (n = 10)	1,2 (0,0–2,7)	0,4 (0,0–0,8)	1,2 (0,0–2,0)
skupina s infiltrací 5–10 % (n = 6)	3,2 (0,4–13,0)	0,4 (0,0–1,2)	1,1 (0,0–4,0)
skupina s infiltrací > 10 % (n = 12)	4,7 (0,8–38,0)	0,4 (0,0–3,2)	2,8 (0,0–4,0)
	Cytometrické hodnocení (% CD138+ buněk)		
	Magn. sep. MNC	Tříděné lyzované buňky	Tříděné MNC
všechny vzorky (n = 28)	1,3 (0,2–25,7)	0,1 (0,0–1,0)	0,1 (0,0–1,0)
skupina s infiltrací < 5 % (n = 10)	0,4 (0,2–2,2)	0,1 (0,0–0,1)	0,0 (0,0–0,3)
skupina s infiltrací 5–10 % (n = 6)	1,8 (0,2–2,8)	0,1 (0,0–0,3)	0,2 (0,1–0,5)
skupina s infiltrací > 10 % (n = 12)	7,6 (0,2–25,7)	0,2 (0,0–1,0)	0,2 (0,0–1,0)



Obr. 1. Algoritmus separace PB z KD (PB-MNC = zastoupení CD38+CD138+ buněk v KD).

PB z KD. Proto jsme provedli paralelní srovnání obou typů separace a analýzu výsledků separací s cílem vytvořit algoritmus poskytující optimální výsledky čistoty v optimálním čase a za rozumnou cenu.

Pro značení buněk před separací používáme protilátku proti znaku CD138 (syndecan-1; pro magnetické značení klon B-B4, pro fluorescenční klon B-A38 – oba odvozeny od buněčné linie U266). Oběma typy separace tak získáváme obdobné buňky. Znak CD138 nesou patologické i normální PB [9] a byl již dříve akceptován jako vhodný a vysoce reprezentativní marker pro selekci PB a pro většinu následných genetických studií [10]. Jak magneticky, tak fluorescenčně značené protilátky proti tomuto znaku jsou běžně komerčně dostupné. Použití pozitivní selekce na základě jednoho znaku s sebou nese výhodu nižší ceny, i když historicky byla preferována negativní selekce [1–2].

Zatímco magnetickou separaci máme optimalizovanou pro mononukleární buňky [7–8], před tříděním jsme vyzkoušeli dvě metody přípravy – přípravu mononukleárních buněk odstředěním na hustotním gradientu a lyzaci červené složky kostní dřeně. Obě metody jsou různými pracovišti používány a i my jsme si ověřili, že z hlediska čistoty získaných frakcí jsou obě použitelné. Separace mononukleárních buněk s sebou nese výhodu redukce celkového počtu buněk, což znamená jednak úsporu protilátek nutných pro označení cílové populace, jednak u fluorescenčního třídění také významné snížení doby nutné pro separaci.

Pro vyhodnocení čistoty získaných populací jsme používali dva různé přístupy –

morfologické hodnocení po cytopsinu a hodnocení průtokovou cytometrií. Hodnoty čistoty, stanovené uvedenými postupy, se u jednotlivých vzorků v různé míře lišily a projevilo se to i v rozdílech ve statistické významnosti. Každá z těchto metod pracuje jinou chybou stanovení – zatímco průtoková cytometrie analyzuje v jednom testu tisíce buněk, morfologické vyhodnocení se provádí v souboru 250 buněk. Průtoková cytometrie podhodnocuje vysoké hodnoty, protože z analýzy nelze nikdy zcela vyloučit ne-buněčné příměsi. Každá z těchto metod také pracuje s trochu jiným parametrem. Ne každá CD138+ buňka musí být buňka plazmatická [11] a ne každá plazmatická buňka musí být nutně CD138+/++ [12]. Nicméně přes některé rozdíly ve statistické významnosti nebyly výsledky z těchto dvou pohledů principiálně odlišné nebo rozporné, a nebyly tedy překážkou při vyvození praktických závěrů z této studie.

Hodnotili jsme pouze čistotu separovaných buněk a nezapomínali jsme se jejich výtěžkem. Bylo to dáno omezeným množstvím plné KD, které jsme mohli použít. Pokud se u jednoho vzorku sešla nízká infiltrace s nízkým celkovým množstvím buněk, získali jsme v pozitivní frakci třeba jen několik tisíc buněk. Tento počet stačil k ověření čistoty pomocí průtokové cytometrie, ale neumožňoval věrohodné vyhodnocení získaného počtu buněk.

Někteří autoři popsali pozitivní korelaci mezi procentem cílových buněk ve vstupním a separovaném materiálu. Např. pro magnetickou separaci CD34+ buněk z periferní krve pomocí přístroje VarioMACS [13], ale také pro negativní imunomagnetickou selekci plazmatických buněk z kostní dřeně [1–2]. V naší studii jsme takovouto jednoznačnou závislost nepotvrdili. Určitou souvislost se vstupní infiltrací jsme ale pozorovali u všech metod – projevila se zužováním intervalu dosažených čistot ve skupinách podle stoupající vstupní infiltrace, a to jak u pozitivní, tak negativní frakce a při obou způsobech vyhodnocení (tab. 2, 5). Výraznější byl tento trend u magneticky separovaných buněk. Úspěšnost třídění buněk je na samotné vstupní infiltraci méně závislá a je zřejmá

více ovlivněna dalšími faktory (nastavení sorteru, definice separované populace apod).

Jako rozhodovací kritérium pro různé typy separace bylo zvoleno zastoupení PB v MNC stanovené průtokovou cytometrií – toto stanovení je u nás rutinně prováděno a v postupu separace představuje prodlevu max. 60 min. Jako cut-off hodnotu pro volbu typu separace jsme stanovili vstupní infiltraci 5%. Magnetickou separaci využíváme u vzorků s infiltrací > 5%, kdy upřednostňujeme jednoduchost a rychlost provedení při přijatelné úspěšnosti dosažení vysoké čistoty vzorku. Fluorescenční třídění se ukázalo jako nenahraditelné u vzorků s infiltrací < 5%, kde je časová náročnost vyvážená vysokou dosaženou čistotou.

Zvládnutí techniky separace PB umožňuje na jedné straně využití moderních výzkumných molekulárně biologických postupů, podmíněných vysokou čistotou studované populace (RT-PCR, aCGH), na druhé straně rozšíření možností již zavedených metodik, jako je např. FISH, na vzorky s velmi nízkou infiltrací. Metodika clg-FISH, kdy příslušné chromozomální aberace odečítáme pouze na PB, odlišných od ostatních buněk KD simultánním obarvením lehkých řetězců cytoplazmatických imunoglobulinů, je sice v našich laboratořích standardně využívána [14], u vzorků s infiltrací pod 5% ale neumožňuje vyšetření 100 PB (dle doporučení workshopu EMN [15]), neboť při menším množství buněk není počet buněk s aberací dostatečně průkazný. Použití separovaných buněk s deklarovanou čistotou je tak přínosem z hlediska vyhodnocení preparátu, navíc představuje i rychlejší a jednodušší proces přípravy a hodnocení z hlediska personálu laboratoře.

V podmínkách naší laboratoře používáme separované buňky jednak ke klinickým (analýza chromozomálních aberací), jednak k výzkumným účelům (RT-PCR, aCGH, proteomická analýza pomocí 2D-elektroforézy a následné hmotnostní spektrometrie). Vyšetřování již zavedených chromozomálních aberací del(13)(q14), del(17)(p13), gain 1q21, t(4;14)(p16;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23) a hyperdiploidie je stále aktuální, protože léčba MM prochází v po-

sledních letech překotným vývojem a vztah těchto aberací k „novým lékům“ je ještě stále nejasný. Vedle klasických prognostických modelů, pracujících s biochemickými či cytogenetickými parametry, jsou publikovány i nové, založené např. na genové expresi [16-18], kterou má smysl provádět právě jen na buněčných populacích s čistotou minimálně 90 %, tedy takovou, která je v neseparované KD nemyšlitelná.

Zvládnutí techniky separace plazmatických buněk u vzorků s nízkou infiltrací nám otevírá také cestu k výzkumu indolentních MG – především MGUS. Zde ovšem nebude možné spoléhat jen na separaci, protože množství získaných plazmatických buněk bude i při optimálním nastavení separace omezené a bude předpokládat optimalizaci technik izolace DNA či RNA směrem k minimalizaci nároků na množství vstupního materiálu. Bez separace je nemyšlitelný i výzkum tzv. nádorových kmenových buněk, které jsou považovány za příčinu relapsů nádorových onemocnění a původce lékové rezistence. Tyto buňky jsou v posledních letech středem zájmu nejen hematologů, ale i onkologů [19] – u myelomu je situace o to komplikovanější, že jejich povaha zatím zůstává nejasná [20].

Závěr

Separace plazmatických buněk z kostní dřeně pacientů s MM je metodicky složitý problém vzhledem k velmi variabilnímu zastoupení plazmatických buněk v kostní dřeni, od velmi nízkých po velmi vysoké hodnoty. Magnetická separace je jednoduchá objemová metoda, která nevyžaduje velké vstupní investice a je

časově nenáročná, neposkytuje ale optimální výsledky čistoty při nízkém vstupním zastoupení PB. Čistota separovaných buněk při fluorescenční separaci je na vstupní infiltraci méně závislá, tento způsob separace je ale časově náročný a vyžaduje vysokou vstupní investici. V podmínkách naší laboratoře se jako optimální ukázalo využití obou metodik. Rozhodovací algoritmus vytvořený na základě srovnání magnetické a fluorescenční separace byl ověřen během prvního roku svého používání. Díky dosaženým výsledkům lze tento algoritmus považovat za validovaný. Optimalizace fluorescenčního třídění nám také otevřela cestu k výzkumu PB u pacientů s MGUS, u kterých jsme nyní schopni získat vysoce čisté populace PB pro náročné výzkumné aplikace.

Poděkování

Děkuji Mgr. Daně Králové za statistické zhodnocení výsledků různých typů separace.

Literatura

1. Fillola G, Müller C, Bousquet R et al. Isolation of bone marrow plasma cells by negative selection with immunomagnetic beads. *J Immunol Methods* 1996; 190(1): 127–131.
2. Tai YT, Teoh G, Shima Y et al. Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched populations. *J Immunol Methods* 2000; 235(1–2): 11–19.
3. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myélome. Cancer Res* 1999; 59(18): 4546–4550.
4. Draube A, Pfister R, Vockerodt M et al. Immunomagnetic enrichment of CD138 positive cells from weakly infiltrated myeloma patients samples enables the determination of the tumor clone specific IgH rearrangement. *Ann Hematol* 2001; 80(2): 83–89.
5. Davies FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003; 102(13): 4504–4511.

6. Rasillo A, Taberero 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(3): 601–609.
7. Fišerová S, Hájek R, Doubek M et al. Imunomagnetická separace myelomových buněk. *Klin Onkol* 2001; 14(2): 46–50.
8. Cumova J, Kovarova L, Potacova A et al. Optimization of myeloma cell selection from bone marrow purified by magnetic-activated cell sorting. *V přípravě.*
9. Wijdenes J, Vooijs WC, Clément C et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; 94(2): 318–323.
10. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: A workshop report. *Cancer Res* 2004; 64(4): 1546–1558.
11. Witzig T, Kimlinger T, Stenson M et al. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31(1–2): 167–175.
12. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998; 100(4): 637–646.
13. Paulus U, Dreger P, Viehmann K et al. Purging Peripheral Blood Progenitor Cell Grafts from lymphoma cells: quantitative comparison of immunomagnetic CD34+ selection systems. *Stem Cells* 1997; 15(4): 297–304.
14. Kuglík P, Filková H, Vranová V et al. Detection of chromosome 13 abnormalities and 14q32 translocations in multiple myeloma using simultaneous immunofluorescent labelling of malignant plasma cells and FISH. *Europ J Hum Genet* 2004; 12 (Suppl): 170.
15. Ross FM, Avet-Loiseau H, Drach J et al. European myeloma network recommendations for FISH in myeloma (Abstract). *Haematologica* 2007; 92 (Suppl 2): 100-101.
16. Zhan F, Huang Y, Colla S et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; 108(6): 2020–2028.
17. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 2007; 109(6): 2276–2284.
18. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F et al. Intergroupe Francophone du Myélome. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol* 2008; 26(29): 4798–4805.
19. Ansorgová V, Mačingová Z, Priester P et al. Nádorové kmenové buňky a „niche“ – jako limitující faktor karcinogeneze. *Klin Onkol* 2009; 22(1): 11–16.
20. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26(17): 2895–2900.