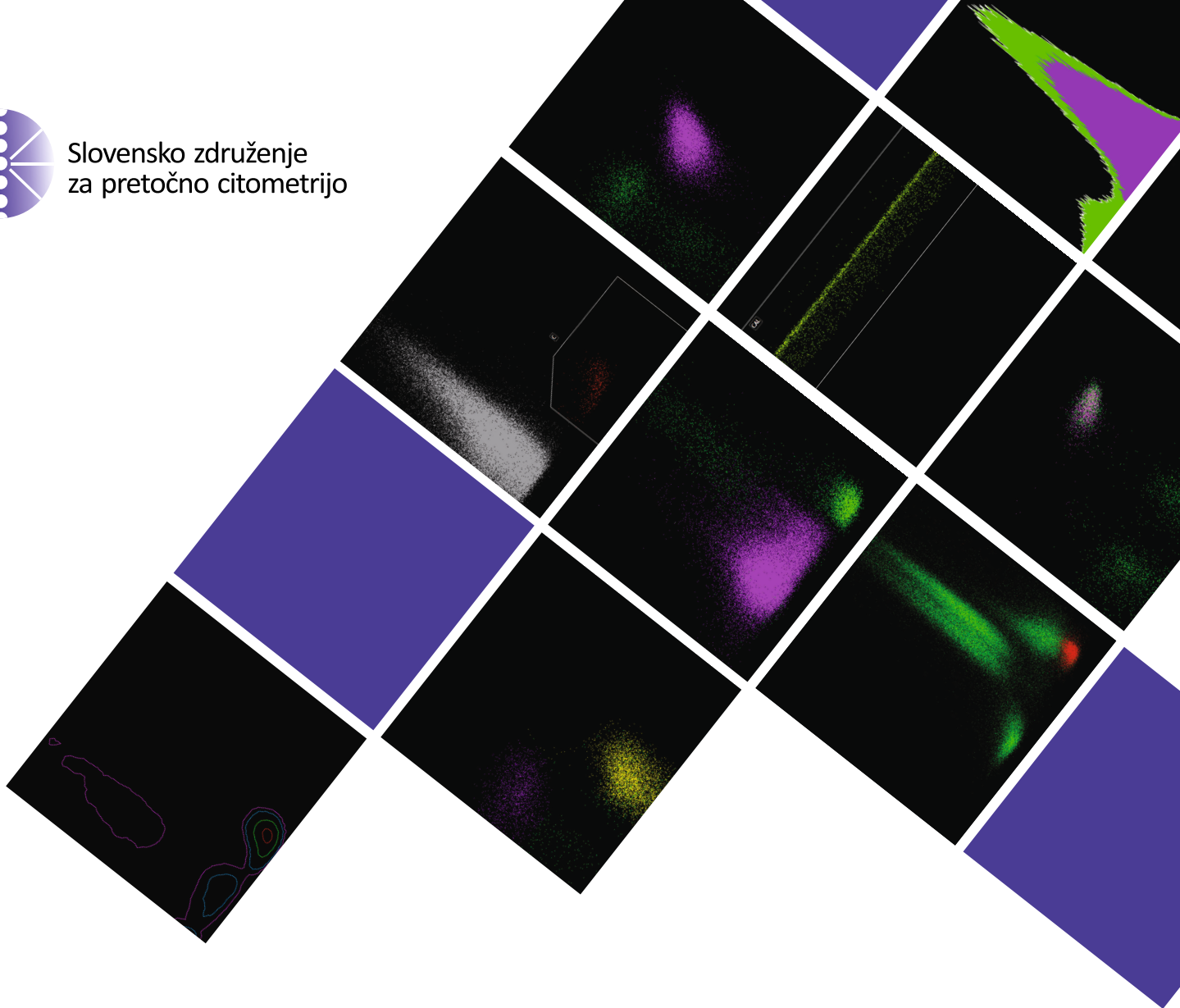
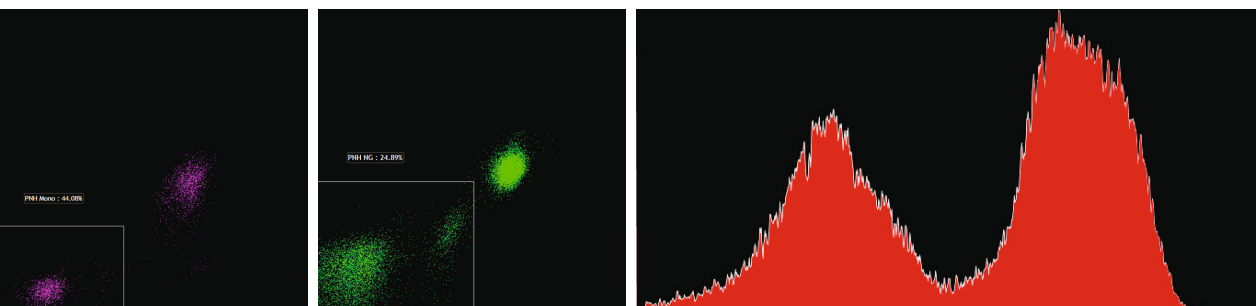


Slovensko združenje  
za pretočno citometrijo



# Vloga **PRETOČNE CITOMETRIJE** pri postavitvi diagnoze in spremljanju zdravljenja bolnikov s krvnimi boleznimi



## **STROKOVNO SREČANJE**

Ljubljana, november 2017





# Vloga pretočne citometrije pri postavitvi diagnoze in spremljanju zdravljenja bolnikov s krvnimi boleznimi

---

**STROKOVNO SREČANJE**

**November 2017**

**Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana**



Strokovno srečanje Slovenskega združenja za pretočno citometrijo

**Organizatorji srečanja:** Slovensko združenje za pretočno citometrijo, KO za hematologijo, UKC Ljubljana in Onkološki inštitut

**Vloga pretočne citometrije pri postavitvi diagnoze in spremljanju zdravljenja bolnikov s krvnimi boleznimi**

Ljubljana, 15. november 2017

Zbornik predavanj

**Znanstveni in organizacijski odbor:** Tadej Furlan, Helena Podgornik, Katarina Reberšek, Darja Žontar

**Uredila:** Helena Podgornik in Tadej Furlan

**Izdal:** Slovensko združenje za pretočno citometrijo

**Tisk:** Infokart d.o.o studio, Ljubljana

**Naklada:** 50 izvodov

**Ljubljana 2017**

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616.15-076.3(082)

VLOGA pretočne citometrije pri postavitvi diagnoze in spremljanju zdravljenja bolnikov s krvnimi boleznimi : strokovno srečanje, november 2017, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana : [zbornik predavanj] / [organizatorji Slovensko združenje za pretočno citometrijo [in] KO za hematologijo, UKC Ljubljana in Onkološki inštitut ; uredila Helena Podgornik in Tadej Furlan]. – Ljubljana : Slovensko združenje za pretočno citometrijo, 2017

ISBN 978-961-94320-0-6

1. Podgornik, Helena 2. Slovensko združenje za pretočno citometrijo 3. Univerzitetni klinični center (Ljubljana). Klinični oddelek za hematologijo 4. Onkološki inštitut (Ljubljana)  
292607488



## PROGRAM SREČANJA

**Sreda 15.11. 2017**

- 14.00-14.10 **Helena Podgornik:** Uvodni pozdrav in predstavitev laboratorijske dejavnosti na Kliničnem oddelku za hematologijo
- 14.10-14.45 **Francise Lacombe:** Harmonemia: A new concept in onco hematology Flow Cytometry - from harmonization to multidimensional data analysis
- 14.45-15.05 **Matjaž Sever:** Uporaba krvotvornih matičnih celic v medicine / Use of haematopoietic stem cells in medicine
- 15.05-15.15 **Tadej Furlan:** Določanje krvotvornih matičnih celic / Analysis of Haematopoietic stem cells
- 15.15-15.35 **Aleš Goropevšek:** Analiza znotrajcelične signalizacije in slikovna pretočna citometrija / Analysis of intracellular signaling and imaging flow cytometry
- 15.35-16.00 **Odmor**
- 16.00-16.20 **Darja Žontar:** Imunofenotipizacija levkemij in limfomov – zgodovina in sedanja praksa na KOH
- 16.20-16.40 **Irena Preložnik Zupan:** Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) - redka bolezen z veliko obrazi
- 16.40-17.00 **Tadej Furlan:** Določanje klona PNH
- 17.00-17.20 **Katarina Reberšek:** Plazmocitom: postavitve diagnoze in določanje minimalne preostale bolezni





## Pretočna citometrija kot del laboratorijske diagnostike na Kliničnem oddelku za hematologijo

**Helena Podgornik**

*Specializirani hematološki Laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

Specializirani hematološki laboratorij je del Kliničnega oddelka za hematologijo (KOH), ki sodi v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana pod Interno kliniko. Sestavljata ga dve enoti, in sicer Enota za citologijo, imunologijo in citogenetiko ter Enota za hemostazo in molekularno genetiko. Pretočna citometrija se izvaja v Laboratoriju za imunologijo in je ob citologiji, citogenetiki in molekularni genetiki eno od področij, ki so ključna za postavitve diagnoze in spremljanje zdravljenja pri krvnih novotvorbah. Multimodalni diagnostični pristop, ki ga izsledki naštetih preiskav zagotavljajo, je bistven za celovito in sodobno obravnavo bolnika s krvno boleznijo. Tesna povezava med kliniki in laboratorijskimi strokovnjaki omogoča, da do vseh potrebnih rezultatov pridemo na najhitrejši možen način. Veliko prednost te tesne povezave vidimo tudi v tem, da zagotavlja hitro vpeljavo novih metod, kar je zlasti v dobi tarčnega zdravljenja zelo pomembno, pretočna citometrija pa tudi pri tem zelo uporabna preiskovalna metoda.

Laboratorij za imunologijo je opremljen z dvema aparatoma proizvajalca Becman Coulter, in sicer s petbarvnim (FC500) in deset barvnim (Navios) pretočnim citometrom. V njem delata dva analitika, inženir laboratorijske medicine in delno specialist medicinske biokemije. Letno opravimo nekaj več kot 2000 preiskav. V zadnjih petih letih beležimo tretjinski porast števila preiskav. Trend povečevanja števila je zaznati domala pri vseh preiskavah. Večino preiskav opravimo za bolnike z oddelka in ambulant KOH, seveda pa tudi za druge naročnike. Primarna preiskovana vzorca sta venska kri (~60% vzorcev) in kostni mozeg (~38% vzorcev), občasno preiskujemo limfatično tkivo, likvor in druge telesne tekočine oziroma tumorsko tkivo. Nekatere preiskave izvajamo izključno le na specifičnih vzorcih (npr. določitev klona PNH v venski krvi), večinoma pa je važneje, da dobimo v analizo vzorce, ki vsebujejo celice, ki jih želimo opredeliti. Najpogosteje preiskujemo levkocite, pri katerih izvajamo sledeče preiskave: imunofenotipizacija levkemij, limfomov in plazmocitoma, določitev koncentracije krvotvornih matičnih celic, opredelitev subpopulacij limfocitov, določitev klona PNH ter določanje merljivega preostanka bolezni. Redkeje določamo spremembe eritrocitne in trombocitne membrane.



Poleg redne rutinske diagnostike v našem laboratoriju za pretočno citometrijo izvajamo tudi terciarno dejavnost. V prvi vrsti je to izobraževanje. Sodelujemo pri izvajanju dodiplomskega študija na Fakulteti za farmacijo ter Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani. Naš laboratorij je učni center za specializante medicinske biokemije, hematologije ter mikrobiologije. Hematologe ter laboratorijske strokovnjake redno seznanjamo z novostmi na sekcijских sestankih Slovenskega laboratorijskega hematološkega združenja in Združenja hematologov Slovenije, ki potekajo dvakrat letno. Terciarna raziskovalna dejavnost je zaradi omejene razpoložljivosti kadrov žal podrejena rutinski diagnostiki. Poleg številnih magistrskih, smo ponosni zlasti na zaključene doktorske naloge. Trenutno na področju pretočne citometrije izvajamo dva terciarna projekta, za prihodnost pa prav na tem področju načrtujemo okrepitev delovanja.

Klinična uporabnost pretočne citometrije je na področju hematologije izjemno pomembna. Njen pomen se je v zadnjih nekaj letih z vedno zmogljivejšimi aparati, ki omogočajo vse bolj kompleksne in občutljive analize, še okrepil, tako da se pojavljajo vedno novi izzivi. Trudimo se, da slovenskim bolnikom zagotavljamo obravnavo, ki je primerljiva z najbolj razvitimi laboratoriji. Verjamemo, da nam je lahko v pomoč tudi strokovno srečanje, kakršno je letno izobraževanje Slovenskega združenja za pretočno citometrijo. Ponuja namreč priložnost, da se v slovenskem prostoru strokovnjaki s področja pretočne citometrije povezujemo, izmenjujemo informacije in na ta način nadgrajujemo znanje.





## **Harmonemia : a new concept in Onco Hematology Flow Cytometry from harmonization to multidimensional data analysis**

**Francis Lacombe**

*Flow Cytometry Department, University Hospital Haut-L'évêque, CHU Bordeaux, France*

The exploration of human bone marrow (BM) is an important tool to understand and diagnose diseases involving altered hematopoiesis. Although morphological identification of cells with distinctive features still remains the basis of these analyses, more sophisticated methods have appeared to be necessary, in particular flow cytometry. The development of monoclonal antibodies identifying hundreds of leukocyte differentiation antigens has been a major step which progressively led to the definition of sets of markers of interest for the various lineages of normal hematopoiesis. Panels specifically addressing suspected diseases have also been consensually designed and are routinely applied in hematology laboratories. In an effort to produce consensual guidelines useful for accreditation procedures, the French Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) organized a series of workshops between 2010 and 2012. They led to the consensual building of two sets of panels, respectively for instruments with 10 or 8 fluorescence detectors. The general principles that governed the constitution of these panels were as follows. We first isolated from the European LeukemiaNet (ELN) mandatory markers, literature and participants' experience, those with diagnostic value in acute leukemia and lymphoproliferative disorders. We then worked a top-down strategy, starting with building ten colors panels, then declining them in eight-colors. We also chose to minimize the number of fluorochromes for a given specificity, whatever the panel involved, in order to better control costs and minimize errors in cocktail preparations. Since rigorous analysis strategies are also highly important, we chose to use CD45 in all tubes, in order to identify leukocyte subsets. A second choice was to use a minimal number of redundant markers providing a backbone for better comparison of labelings in different tubes. These panels thus allow for straightforward examination of each fluorescence expression, using a SSC/FL display, then biparametric histograms and backgating strategies.

The increasing sophistication of flow cytometers has led to more and more stable and reproducible data. Concomitantly, this has been accompanied by the elaboration of more and more powerful software allowing for refined multiparametric analysis.

To assess reproducibility of immunophenotyping analysis between different laboratories and different flow cytometers, we developed a new concept called Harmonemia which has been published in Leukemia



in 2016. We will focus here on the first two steps of this project, namely the harmonization of photomultiplier (PMT) settings and the staining of normal peripheral blood (PB) with a common antibody panel. The Harmonemia project involved 23 instruments from Beckman Coulter (BC, n= 16) and BD Biosciences (BD, n= 7) in 17 laboratories for PMT settings. Ultimately, Harmonemia aims at working in lysis/ no wash protocols. In such settings, normal cells in the sample act both as calibrators and as controls. Autofluorescence provides internal calibration for PMT settings while intrinsic positive control is provided by proper labeling of cell populations targeted by the reagents used. It is thus important that the PMT be set in such a way that the majority of unstained cells appear above channel 1 for each applied fluorescence. In Harmonemia's primary laboratory, at Bordeaux University Hospital, ten 50- $\mu$ l samples of unstained PB lysed with Versalyse (BC) were acquired while adjusting PMTs in order to have at least 80% of leukocytes fulfilling the channel 1 criterion described above. On the same instrument, Flow-Set Pro (BC) beads were run with these PMT values, yielding target channel (TC) values for each fluorescence. Aliquots of the same batch of Flow-Set Pro were distributed, together with TC, to all participants to be applied directly on Navios instruments and after multiplying the target values by 256 on Cantoll instruments. The efficiency of this harmonization was checked by running five unstained-lysed normal PB samples in each facility. Listmode files were analyzed collectively during specific workshops.

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	PC	Alexa 700	Alexa 750	Pacific Blue	Krom Orange or V500
CYTOPLASMIC ORIENTATION	(TdT) or MPO	MPO or CD10	cCD13	CD33	CD34	cCD79a	cCD22	cCD3	sCD3 or CD11b	CD45
CYTOPLASMIC COMPLEMENT	K	L			CD34	IgM				CD45
B-ALL (A)	CD58	CD10			CD34	CD123		CD19	CD38	CD45
B-ALL (B)	CD81	CD10	CD13	CD33	CD34	CD15	CD22	CD19	CD20	CD45
T-ALL (A)	CD1a	CD10	CD4	CD5	CD8	CD2	CD7	cCD3	CD3	CD45
T-ALL (B)	(TdT)	CD99	CD13	CD33	CD34	CD117		cCD3	CD3	CD45
AML (A)	CD65/15	CD14	CD13	CD33	CD34	CD117	CD7	CD11b	CD16	CD45
AML (B)	CD64	CD10	CD4	CD33	CD34	CD123	CD56	CD19	CD38	CD45
AML (C)	CD36	CD61	(CD24)	CD33	CD34	CD15	CD2	CD71	DR	CD45
LPD ORIENTATION WASHED (A1)	K	L	CD4	CD5	CD8	CD3	CD56	CD19	CD20	CD45
CLL POST ORIENTATION (A2)	CD81	CD43 or CD38		CD5	CD23	CD79b	CD22	CD19	FMC7	CD45
CLL DIRECT WASHED (B1)	K	L		CD5	CD23	CD79b	CD22	CD19	FMC7	CD45
CLL COMPLEMENT (B2)	CD81	CD43		CD5	CD23	CD38	CD22	CD19	CD20	CD45
LPD (C)	CD103	CD10	CD13	CD5	CD11c	CD123	CD25	CD19	CD20	CD45
T/NK LPD (A)	DR	CD10	CD4	CD5	CD8	CD2	CD7	CD25	CD3	CD45
T/NK LPD (B)	TCRGD	TCRAB		CD5	CD8	CD2	CD56	CD16	CD57	CD45



Each laboratory used normal unstained lysed PB to check PMT settings. A panel devised within the GEIL for the diagnosis of acute leukemias was then applied to perform compensations with Versacomp (BC) beads and stain PB in each laboratory. Single staining of positive beads (coated with anti-mouse immunoglobulin antibodies) was performed in separate tubes, also containing negative (unstainable) beads. After incubation, all tubes were acquired without compensation with the PMT defined in the previous step. The wizard positive/negative option of Kaluza (BC) was then applied to each facility's listmode files to obtain the respective individual matrices, which turned out to be highly comparable.

In the next step, in each platform, 50  $\mu$ L of four normal PB samples were incubated with the antibody panel and acquired on each of the 23 flow cytometers. After 15 -min incubation and Versalyse lysis, the samples were run using the PMT and compensation matrices previously established. All listmodes were analyzed collectively. The merge function of Kaluza and pre-set gates were used to confirm harmonization.

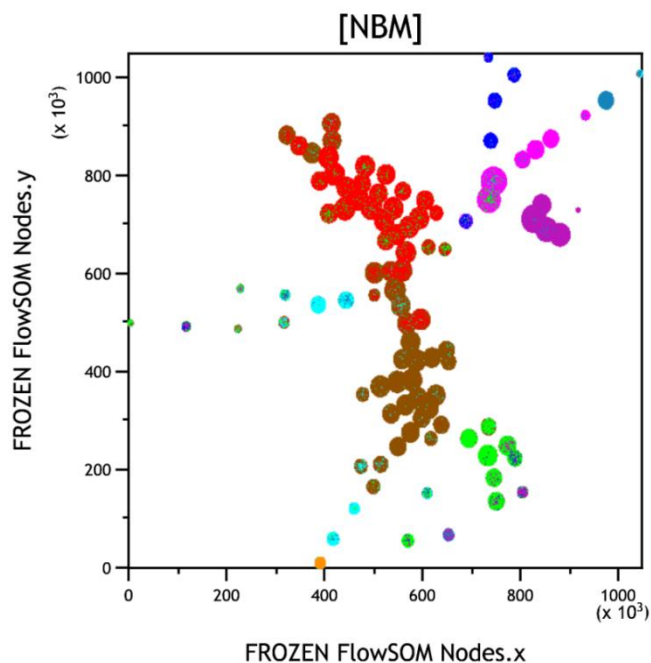
In summary, this study of the Harmonemia working group reports on a robust strategy allowing for a successful cross-instrument harmonization on a large scale. It extends former studies and provides an operating procedure applicable anywhere, independently of the instrument available. Thus, the Harmonemia project now aims at providing reference material available for such assessments overcoming inter-individual variability.

Once harmonization between different flow cytometers had been processed using Harmonemia, new mathematical algorithms were applied to listmode files in order to bypass the subjective gating currently used in flow cytometry. In the literature, mathematical tools have been devised to calculate distances (short or long) between clusters of similar items. These tools have also been expanded to dissect cellular subpopulations, mostly for immunological studies or drug sensitivity appreciation. Principal Component Analysis (CPA) soon appeared to be too limited to perform such complex clustering. Other solutions such as SPADE, t-SNE, v-SNE, X-shift or Phenograph have been developed and applied to various settings, including acute myeloblastic leukemia (AML) samples. Although these solutions provide a highly refined delineation of cell subsets, they suffer from several disadvantages. One is the length of the analysis, which classically lasts for several hours. Others are the number of cells assessable without saturating the algorithms and the variability of graphical results, different each time a data set is ran. Seeking for improvement, van Gassen et al. have developed an unsupervised algorithm called "Flow Self Organizing Maps" or FlowSOM. After using it for mass cytometry data, these authors applied it to classical flow cytometry list modes. The major goal in developing FlowSOM was to reduce the length of analysis, now in the order of a few minutes. FlowSOM organizes data in nodes, representing the subsets identified, in trees based on the distance separating each node. The size of the nodes is also proportional to the number of cells identified as similar.



As mentioned, such software has proven very powerful to identify cell subsets in numerous types of experiments, including the analysis of BM samples. Interindividual variations however complicate the comparison of malignant and normal samples. This stresses the importance of first establishing precise SOPs, as in Harmonemia, including both settings and antibody panels. After this prerequisite, it becomes possible to merge such harmonized data from several samples. Doing this with normal BM allows to obtain an “ideal” representation of hematopoiesis. A large database of several hundreds of samples processed at diagnosis and follow-up from patients with acute leukemia or myelodysplasia has thus been acquired in Bordeaux, according to these principles. This information is currently used to explore the capacities of FlowSOM applied to human hematopoiesis.

Specific R-software scripts and Bioconduct or CRAN packages are first used to normalize fluorescence and light diffusion intensities including shifts, compensation and biexponential/logical adjustment. New FlowSom parameters thus generated can be analyzed with the Kaluza<sup>®</sup> software (BC). This resulted in automated unsupervised graphical representations, allowing with Kaluza<sup>®</sup> for a direct comparison of NBM and pathological samples for each case. Interestingly, HF files generated by the R software being integrated in the fcs file of each sample, they could also be analyzed in a supervised manner, by drawing gates around nodes of interest. Such gates allow to further dissect data by backgating on classical biparametric representations of antibody combinations as well as on the classical CD45/SSC bone marrow cartography.



This novel approach thus combines an automated multidimensional representation of numerous subsets and their precise analysis by classical tools of FCM analysis. The power of flow cytometry, which, at variance from CyTOF, preserves and uses morphological characteristics of the cells (i.e. FSC and SSC) can thus be combined to precise mathematical analyzes.



## Uporaba krvotvornih matičnih celic v medicini

Matjaž Sever

*Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

### Uvod

Področje celičnega zdravljenja je danes razvejeno in obsega številne različne načine zdravljenj. V klinični praksi že več desetletij uporabljamo kostni mozeg in krvotvorne matične celice, ki jih pridobimo iz krvi z mobilizacijo in aferezo. V zadnjih letih se nova celična zdravljenja razvijajo s pospešenim tempom. Zaradi njihove heterogenosti in včasih tudi nejasnosti pri njihovem poimenovanju jih označujemo s skupnim izrazom 'napredni medicinski terapevtski produkti' (ang. advanced therapy medicinal products - ATMP). Razdelimo jih v tri skupine: celični produkti somatskih celic, produkti genske terapije in produkti za tkivno regeneracijo. Večina omenjenih produktov ima podobne lastnosti kot klasični celični produkti, ki jih uporabljamo pri presaditvi krvotvornih matičnih celic oz. infuziji donorskih limfocitov. Kljub temu pa ATMP regulira lastna zakonodaja. Njihov razvoj in uporaba sta omejena na akademske centre in specializirane ustanove. V Sloveniji sta to Univerzitetni klinični center in Zavod za transfuzijsko medicino. S širjenjem področja s komercialnimi produkti, kot so mezenhimske matične celice, cepiva iz dendritičnih celic, T-celicami s himernim antigenskim receptorjem in genetsko spremenjenimi avtolognimi matičnimi celicami za popravilo genetskih napak (beta talasemija, hemofilija), pa bo področje potrebno ustrezno strokovno in zakonsko razvijati.

Za razvoj vseh ATMP v postopku potrebujemo bolnika ali darovalca. Pri večini uporabimo kri, kostni mozeg ali aferezni pripravek. Ti postopki se izvajajo na hematoloških oddelkih s transplantacijskim programom in zavodih za transfuzijsko medicino. Privatna podjetja šele po tej začetni stopnji naknadno sodelujejo v postopku zdravljenja.

V Sloveniji opravljamo presaditve kostnega mozga od leta 1989. V zadnjem desetletju pa smo razvili tudi nove načine zdravljenj s celicami kostnega mozga (1).

### Program presajanja kostnega mozga na KO za hematologijo

Na KO za hematologijo, UKC Ljubljana smo prvo presaditev kostnega mozga (PKMC) opravili leta 1989, leta 2002 pa smo pričeli z rednim programom alogeničnih presaditev. Danes letno opravimo okrog 110 presaditev kostnega mozga, od tega okrog 40 alogeničnih. Več kot 95% presaditev poteka s krvotvornimi



matičnimi celicami iz periferne krvi, ostale so iz kostnega mozga, izjemoma pa se odločimo za popkovnično kri. Večina darovalcev kostnega mozga pri nesorodni presaditvi prihaja iz nemškega registra. Za kondicioniranje uporabljamo pri AML in MDS najpogosteje protokol Cy-Bu, pri ALL Cy-TBI, pri diseminiranem plazmocitomu Mel200 in za NHL Cy-TBI ali BEAM. Naša standardna profilaksa reakcije presadka proti gostitelju je CSA/MTX pri mieloablativni oz CSA/MMF pri nemieloablativni PKMC v kombinaciji z antitimocitnim imunoglobulinom. Delež bolnikov, ki razvije reakcijo presadka proti gostitelju znaša okrog 50%. Dolgoročna preživetja pri bolnikih so pri KML okrog 70%, pri AML okrog 60% in pri diseminiranem plazmocitomu 40%. Od leta 2014 opravljamo transplantacijsko dejavnost v novih prostorih, ki imajo pogoje s filtriranim zrakom (2).

### **Zdravljenje dilatativne in ishemične kardiomiopatije z avtolognimi CD34+ celicami in mezenhimskimi matičnimi celicami**

Program presajanja avtolognih krvotvornih matičnih celic pri bolnikih z dilatativno kardiomiopatijo poteka od leta 2006. Krvotvorne matične celice pridobimo z mobilizacijo in aferezo, nato pa izvedemo CD34 pozitivno selekcijo in presaditev v srce. Najprej se je vračanje celic izvajalo v koronarno arterijo za predel miokarda, ki je bil najbolj prizadet. S prihodom sistema NOGA za mapiranje električne aktivnosti miokarda pa poteka aplikacija z mikroinjekcijami v točno določen predel srca. Na ta način dosežemo boljšo retenco matičnih celic na želenem mestu. Drug pomemben dejavnik je zadostno število presajenih matičnih celic, ki ga zagotavljamo s standardno mobilizacijo kot pri hematoloških bolnikih in darovalcih. Letno opravimo okrog 40 presaditev celic, tako da smo do danes zdravili več kot 300 bolnikov. Postopek pri bolnikih privede do izboljšanja črpalne sposobnosti srca, elektromehanskih lastnosti srca, zmanjšanja števila hospitalizacij in podaljšanja preživetja. V zadnjem obdobju opravljamo presaditve alogeničnih mezenhimskih matičnih celic v sklopu mednarodne raziskave, ki je del programa Horizon (3).

### **Zdravljenje reakcije presadka proti gostitelju z mezenhimskimi matičnimi celicami**

Mezenhimske matične celice imajo lastnost imunosupresivnega delovanja ob še drugih lastnostih diferenciacije in vloge pri popravi tkiv. Reakcija presadka proti gostitelju po PKMC je v približno polovici primerov rezistentna na primarno zdravljenje s kortikosteroidi. Takrat uporabljamo več vrst imunosupresivnih zdravil, za katere se odločamo individualno od bolnika do bolnika. Od leta 2004 so mezenhimske celice pričeli uporabljati za zdravljenje primarno rezistentne reakcije presadka proti gostitelju. V Sloveniji jih uporabljamo od 2011 za izbrane primere bolnikov, običajno po uporabi drugih imunosupresivov. Rezultati zdravljenja so spodbudni (4).



## **Zdravljenje Crohnove bolezni z mezenhimskimi matičnimi celicami**

Crohnova bolezen je sistemska bolezen, ki se navadno kaže s kroničnim vnetjem gastrointestinalnega trakta in poteka s poslabšanji in izboljšanji doživljenjsko. Za zdravljenje imamo na voljo različna zdravila za indukcijo in vzdrževanje remisije: od kortikosteroidov, aminosalicilatov, imunomodulatorjev do novejših bioloških zdravil (inhibitorji TNF alfa). Pri 10% bolnikov so naša prizadevanja neuspešna. Pri teh se je izkazala vloga mezenhimskih matičnih celic, ki imajo imunomodulatorno vlogo. Protokol zdravljenja je zaenkrat eksperimentalen v fazi 2, zdravili smo le nekaj bolnikov (5).

## **Zdravljenje zavrnitve presajene ledvice z mezenhimskimi matičnimi celicami**

Transplantacija ledvice je metoda nadomestnega zdravljenja ledvične odpovedi, ki bolnikom s končno odpovedjo ledvičnega delovanja ponuja najdaljše preživetje. Med poglavitnejšimi omejujočimi dejavniki za podaljšanje delovanja presajene ledvice je s protitelesi posredovana zavrnitev presadka. Ustaljeno zdravljenje sestoji iz odstranjevanja protiteles usmerjenih proti darovalcu s pomočjo terapevtske afereze, imunomodulatornega zdravljenja s kortikosteroidi in intravenskimi imunoglobulini ter prevedbe bolnika iz ciklosporina na takrolimus. Med novejšimi zdravili sta rituximab in bortezomib. Kljub omenjenim pristopom pa del bolnikov ne odgovori na zdravljenje. Pri teh so se izkazale kot delno uspešne, predvsem pa varne v zdravljenju mezenhimske matične celice. Za njihovo uporabo v ta namen pripravljamo klinično raziskavo faze 2 (6).

## **Intratekalna aplikacija C133+ matičnih celic in vpliv na funkcijsko okrevanje bolnikov z možgansko kapjo**

Ishemična možganska kap je najpogostejša oblika kapi in je posledica zapore srednje velikih in malih možganskih arterij. Najpogostejši vzroki so zapore zaradi tromboze ali embolije ter endotelna okvara. Čimprejšnja razrešitev zapore z vzpostavitvijo pretoka poteka z rt-PA in pomembno prispeva k boljšemu funkcionalnemu izhodu bolnikov. Žal pomemben delež bolnikov zamudi časovno okno za ta način zdravljenja. Pri zdravljenju možganske kapi s celicami kostnega mozga te sodelujejo lahko z diferenciacijo v nevrone ter izločanjem citokinov in s tem vplivanjem na angiogenezo in sinaptogenezo. CD133+ matične celice, ki jih predhodno pridobijo z aferezo in pozitivno selekcijo, bi tako aplicirali intratekalno in sledili odgovor. Trenutno raziskava na začetku, bolniki še niso bili vključeni (7).

## **Uporaba trombocitnega pripravka za popravo kostnih defektov**

V travmatologiji za premostitev kostnih defektov uporabljajo različne pristope. V Sloveniji imamo v sodelovanju z Zavodom za transfuzijsko medicino možnost zdravljenja s kombinacijo alogenskega



trombocitnega koncentrata v kombinaciji z avtologno kostjo. Na ta način sinergistično delujejo rastni dejavniki trombocitov in osteogene matične celice (8).

## Zaključki

Celično zdravljenje je široko in hitro razvijajoče področje, ki mu poskušamo čim bolj slediti. V Sloveniji smo dejavni na več področjih s klasičnimi, uveljavljenimi pristopi, obenem pa si prizadevamo razviti zdravljenja na novih področjih. V prihodnosti bo največji izziv vzpostavitev zdravljenja s CAR-T celicami, ki so komercialno že na voljo za nekatere bolezni.

## Literatura

1. Lowdell MW, Thomas A. The expanding role of the clinical haematologist in the new world of advanced therapy medicinal products. *Br J Haematol.* 2017;176(1):9-15.
2. Pretnar J. Overview of hematopoietic stem cell transplant activity at UMC Ljubljana. EBMT CMWP meeting, Ljubljana, September 2017.
3. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res.* 2013;112(1):165-73.
4. Munneke JM, Spruit MJ, Cornelissen AS, van Hoeven V, Voermans C, Hazenberg MD. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation.* 2016;100(11):2309-2314.
5. Martínez-Montiel Mdel P, Gómez-Gómez GJ, Flores AI, et al. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(5):1211-27.
6. Peired AJ, Sisti A, Romagnani P. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease: A Review of Clinical Evidence. *Stem Cells Int.* 2016:4798639. Epub 2016 Sep 19.
7. Mancías-Guerra C, Marroquín-Escamilla AR, González-Llano O, Villarreal-Martínez L, Jaime-Pérez JC, García-Rodríguez F, Valdés-Burnes SL, Rodríguez-Romo LN, Barrera-Morales DC, Sánchez-Hernández JJ, Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, Gómez-De León A, Elizondo-Riojas G, Salazar-Riojas R, Gómez-Almaguer D. Safety and tolerability of intrathecal delivery of autologous bone marrow nucleated cells in children with cerebral palsy: an open-label phase I trial. *Cytotherapy.* 2014;16(6):810-20.
8. Smrke D, Gubina B, Domanović D, Rozman P. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. *Eur Surg Res.* 2007;39(3):170-4.





## Določanje krvotvornih matičnih celic

Tadej Furlan

*Specializirani hematološki Laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

### Uvod

Presajanje krvotvornih matičnih celic (KMC) se pri zdravljenju malignih bolezni krvotvornih organov, zlasti levkemij, limfomov ter plazmocitoma v kombinaciji s kemoterapijo uspešno uporablja že 50 let. KMC za presajanje lahko pridobimo iz kostnega mozga, v zadnjih 20-ih letih pa večinoma s postopkom citaferenze iz periferne krvi. Vir KMC je tudi placentarna kri, vendar ta pride v poštev zaradi nižjega števila KMC predvsem pri zdravljenju otrok. Če zberemo KMC bolnika samega, govorimo o avtologni presaditvi KMC (PKMC), če pa jih dobimo od skladnega darovalca, govorimo o alogenični PKMC. Darovalec je lahko sorodnik, vse pogosteje pa gre za nesorodnega darovalca. KMC pri bolnikih mobiliziramo z G-CSF in zberemo s pomočjo citaferenze. Koncentracijo jim določimo pred zbiranjem in nato v zbranem koncentratu. Preden se začne zbiranje KMC iz venske krvi je željeno, da je njihova koncentracija v venski krvi vsaj  $3 \cdot 10^9/L$ . Za eno transplantacijo je pri bolniku potrebno zbrati vsaj  $2 \cdot 10^6$  celic/kg telesne teže prejemnika. Za določanje KMC uporabljamo pretočno citometrijo, ki njihovo koncentracijo določa na osnovi morfoloških lastnosti in izražanja značilnih celičnih označevalcev (1).

Pri določanju števila krvotvornih matičnih celic se poslužujemo protokola ISHAGE, ki upošteva specifične lastnosti krvotvornih matičnih celic glede na njihovo nahajanje v točkovnem diagramu, prednjega in stranskega sipanja svetlobe ter izražanje kombinacije monoklonskih protiteles CD34 in CD45, ki sta značilni za KMC. Protokol upošteva samo žive celice, ki jih določimo z uporabo fluorescentnega barvila 7-AAD (2). Za določanje koncentracije KMC lahko uporabljamo dva pristopa: enostopenjskega in dvostopenjskega. Pri enostopenjski metodi pretočni citometer določi absolutno število CD34 pozitivnih celic z uporabo BEADS-ov. To so komercialno dostopni delci lateksa s točno določeno koncentracijo, ki jo v programsko opremo vnesemo kot kalibracijski faktor. Pri dvostopenjski metodi pa za določitev absolutnega števila CD34 pozitivnih celic uporabljamo poleg pretočnega citometra tudi hematološki analizator. Pri tej metodi izračunamo absolutno število KMC kot delež CD34 pozitivnih celic (pridobljenih s pomočjo pretočnega citometra) glede na število levkocitov (pridobljeno s pomočjo hematološkega analizatorja) (2).



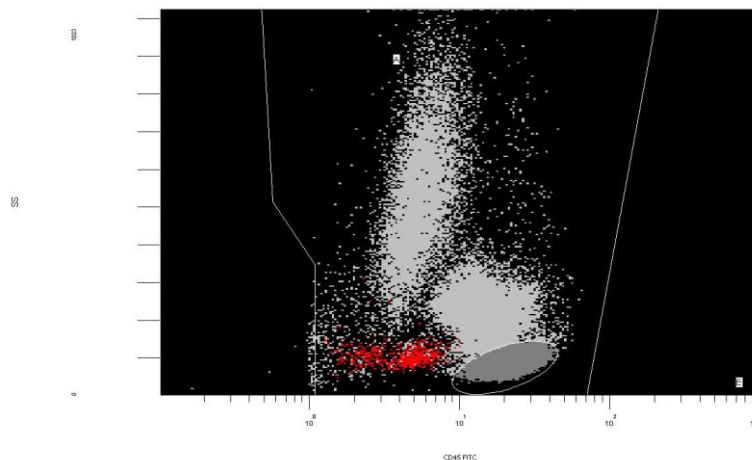
## Priprava vzorca za analizo

Preden se vzorec inkubira z monoklonskimi protitelesi je potrebno preveriti število levkocitov in se prepričati, da jih je v vzorcu manj kot  $30 \cdot 10^9/L$  in več kot  $3 \cdot 10^9/L$ . Če je levkocitov preveč, je potrebno vzorec redčiti. Nato sledi inkubacija 100  $\mu L$  vzorca z monoklonskimi protitelesi (CD45 in CD34). Za določanje viabilnosti se uporablja fluorescentno barvilo 7-AAD (7-amino-aktinomycin). Vzorec inkubiramo 20 min. Po končani prvi inkubaciji je potrebno lizirati eritrocite z uporabo komercialnih reagentov ali z  $NH_4Cl$ . Pri enostopenjski metodi (izračun absolutnega števila CD34 pozitivnih celic) pa je potrebno po lizi eritrocitov dodati tudi BEADS-e.

## Protokol ISHAGE

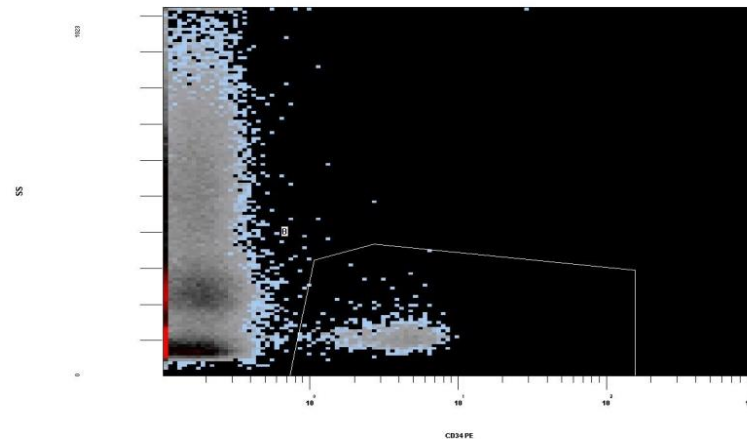
Strategija ISHAGE protokola je zajemanje populacije KMC v posameznih korakih. Na ta način zmanjšamo možnost interference zaradi nespecifične vezave protiteles:

1. Najprej je potrebno zajeti vse levkocite glede na njihove lastnosti stranskega sipanja (SS) in izražanja CD45 (3). Na ta način ločimo levkocite od eritrocitov, trombocitov ter ostalih razpadlih celic (Slika 1).



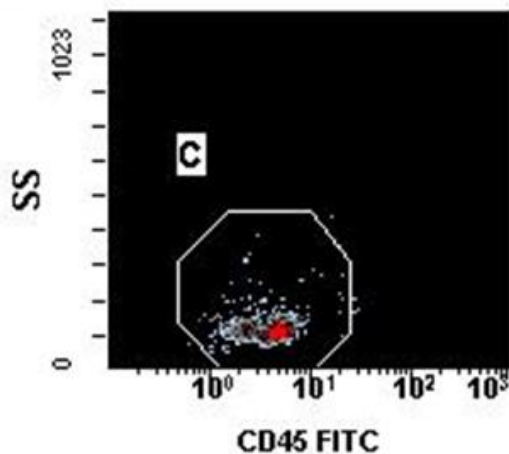
Slika 1: Ločitev populacij levkocitov na osnovi stranskega sipanja in izražanja CD45

2. V naslednjem koraku ločimo KMC glede na njihovo izražanje CD34 in njihovo SS (Slika 2). Na točkovnem diagramu se KMC glede na izražanje CD45 nahajajo v področju blastov (Slika 1). Študije so pokazale, da je protitelo proti CD45 najbolje uporabljati konjugirano s fluorescein izotiocianatom (FITC), CD34 pa s fikoeritriinom (PE) (3).

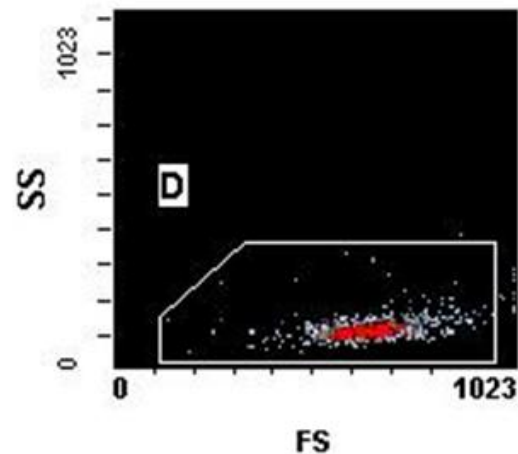


Slika 2: Zamejitev KMC na osnovi stranskega sipanja in izražanja CD45

3. V naslednjih korakih se poskuša še bolj zamejiti CD34 pozitivne celice, določene v predhodnem točkovnem diagramu (Slika 2). S tem izločimo nespecifično vezavo protiteles in autofluorescenco ostalih celic. Najprej se KMC zameji z uporabo SS in CD45 (Slika 3), nato pa še glede na njihove značilnosti stranskega in prednjega sipanja svetlobe (Slika 4) (3).



Slika 3: Dodatno zamejevanje na osnovi SS in CD45



Slika 4: Dodatno zamejevanje na osnovi stranskega in prednjega sipanja svetlobe

### Podajanje rezultatov

KMC se določa pred zbiranjem v krvi darovalca, nato pa se zbrane celice določa še v koncentratu po zbiranju. Pred odvzemom se v krvi darovalca, odvzeti z EDTA, določi, če je koncentracija CD34 pozitivnih celic vsaj  $20 \cdot 10^6/L$ , da se lahko zbiranje na Zavodu RS za transfuzijsko medicino lahko začne zbirati KMC. Po zaključenem zbiranju se manjšo količino koncentrata KMC pošlje v laboratorij, kjer se vnovič določi koncentracija KMC, le ta pa preračuna na telesno težo prejemnika. Ker je v koncentratu KMC višje število



levkocitov kot v venski krvi, je potrebno vzorec, pred inkubacijo s protitelesi, redčiti s PBS do želenega območja koncentracije levkocitov. Za preračun absolutnega števila CD34 pozitivnih celic na telesno težo prejemnika poleg deleža CD34 pozitivnih celic potrebujemo tudi podatke o celotnem volumnu koncentrata ter seveda telesno težo prejemnika.

Končni izvid vsebuje podatke o naročniku in bolniku, v primeru alogenične transplantacije vsebuje tudi priimek in ime darovalca. Poleg teh podatkov so v izvidu navedena tudi rezultati posameznih določanj koncentracije KMC pred in po zbiranju.

### Zaključek

Zdravljenje z avtologno in alogenično PKMC predstavlja v Sloveniji standarden način zdravljenja številnih krvnih bolezni, predvsem akutnih levkemij, plazmocitoma in malignih limfomov. Uspešno se razvijajo tudi drugi načini uporabe KMC, predvsem pri zdravljenju srčnega popuščanja in v zadnjih letih tudi uporaba *in vitro* namnoženih mezenhimskih matičnih celic. Natančno določanje njihove koncentracije je ključno za izvedbo vseh teh zahtevnih postopkov zdravljenja.

### Literatura

1. Andoljšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Koželj M., Černelč P. Interna medicina. Ljubljana: LitteraPicta, Slovensko medicinsko društvo; 2011:1243-1389
2. Whitby A., Whitby L., Fletcher M. et al. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? Cytometry part B 2012;82B:9-17
3. Sutherland D.R., Anderson L. et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. J Hematotherapy 1996;5:213-226



## **Analiza znotrajcelične signalizacije in slikovna pretočna citometrija**

**Aleš Goropevšek**

*Oddelek za laboratorijsko diagnostiko, UKC Maribor*

V diagnostiki krvnih bolezni s pretočno citometrijo določamo podvrste-subpopulacije levkocitov na osnovi njihovih površinskih celičnih označevalcev. Konsistentnega površinskega fenotipa pa ne kažejo funkcionalno nezrele populacije levkemičnih celic pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML), ki so jih nedavno opredelili le na osnovi citometrične analize njihovih znotrajceličnih signalnih odzivov (1).

Od površinskih receptorjev do transkripcije genov vodijo številne znotrajcelične signalne poti, ki nadzirajo različne celične procese: od diferenciacije, proliferacije in distribucije v celičnem ciklu do programirane celične smrti – apoptoze (2). Spremembe v genih, ki kodirajo signalne molekule, so tako povezane z rezistenco na apoptozo in s proliferativnim potencialom maligno spremenjenih celic in so pogoste tudi pri hematoloških neoplazmah (3,4). Znotrajcelični signali se prenašajo v kompleksnem procesu proteinsko - proteinskih interakcij, posttranslacijskih modifikacij (npr. acetilacije in fosforilacije) in proteinskih translokacij. Fosforilacijo proteinov katalizirajo kinaze, ki imajo osrednjo vlogo v celičnih procesih metabolizma, homeostaze, komunikacije med celicami in delovanju imunskega sistema (2,5).

Zaradi pomembne vloge kinaz v normalni fiziologiji najdemo spremenjeno - aberantno kinazno aktivnost v patogenezi številnih krvnih bolezni (4-7). Skladen s tem je tudi razvoj in terapevtska aplikacija farmakoloških inhibitorjev kinaz. Novejše terapevtske tarče zdravljenja Ne-hodkinovih limfomov (NHL) so kinaze BTK, PI3K in SYK, ki jih najdemo v signalni poti od B-celičnega receptorja (BCR). Na osnovi citometrične analize znotrajcelične signalizacije so opisali značilne razlike tako bazalne kot z anti-BCR inducirane fosforilacije med bolniki s kronično limfocitno levkemijo, limfomom plaščnih celic, folikularnim limfomom in difuznim velikoceličnim B limfomom. Ob tem so ugotavljali negativno korelacijo med BCR-inducirano signalizacijo in njeno občutljivostjo na BTK- in SYK- inhibitorje, kar bi lahko bilo povezano tudi z različnimi odzivi na zdravljenje (8).

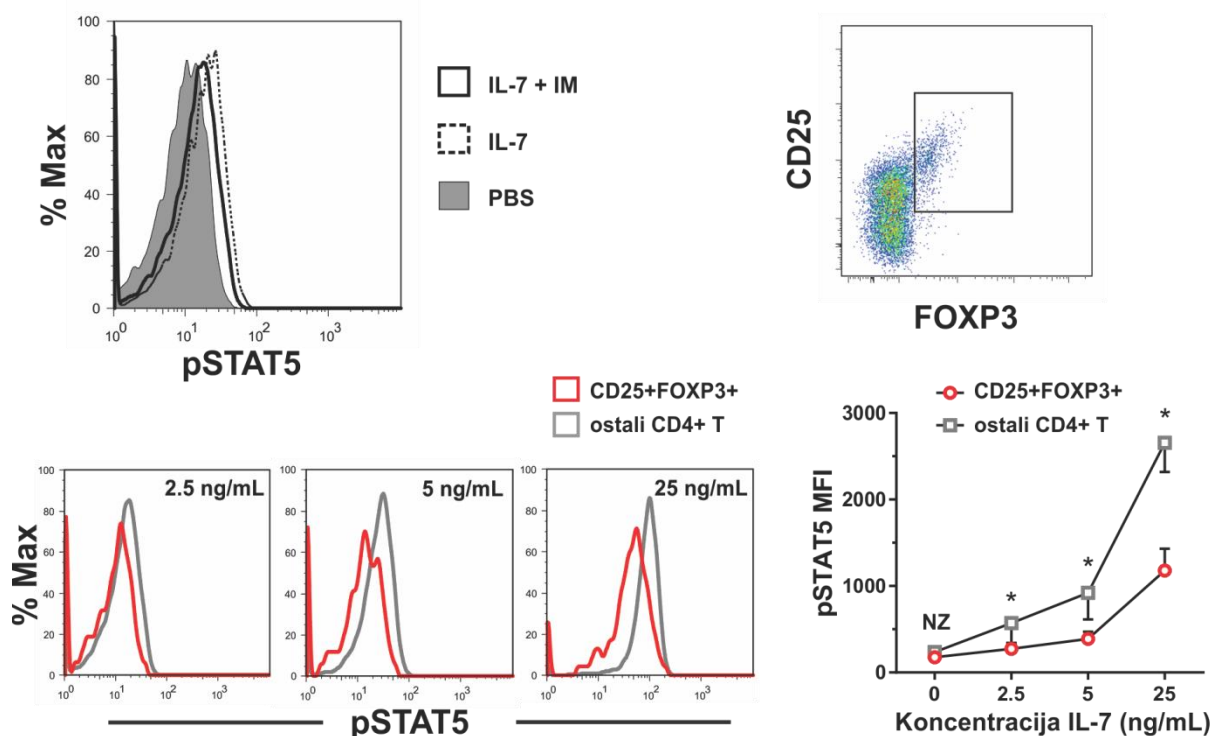
V biologiji hematopoetskih celic so bistvene tudi signalne poti JAK/STAT, ki jih uporabljajo receptorji klinično pomembnih citokinov: G-CSF, eritropoetina, trombopoetina, interferonov, interlevkinov. V kanonični signalni poti JAK/STAT vezava citokina na površinski receptor sproži aktiviranje JAK kinaz in posledično fosforilacijo proteinov STAT na značilnem tirozinskem ostanku. Proteini STAT so hkrati signalne



molekule in transkripcijski faktorji: po fosforilaciji sledi prenos - translokacija v jedro, kjer se z vezavo na ustrezno mesto aktivira prepisovanje – transkripcija s citokinom-reguliranih genov (5).

Na univerzi Stanford so razvili metode, ki omogočajo analizo JAK/STAT in drugih kinaznih signalnih poti tudi v redkih subpopulacijah levkocitov (9,10). Takšni novi pristopi so bili nedavno uporabljeni v kombinaciji z masno citometrijo pri spremljanju signalnih poti v krvnih celicah bolnikov s kronično mieloično levkemijo (KML), pri kateri translokacija med kromosoma 9 in 22 pripelje do nastanka fuzijskega proteina Bcr-Abl1 (11). Eden prvih primerov tarčne terapije krvnih bolezni s specifičnimi inhibitorji tirozinskih kinaz (TKI) je bila uporaba inhibitorja Bcr-Abl1 imatinib mesilata (IM) v zdravljenju KML (12). Novejši TKI, kot je nilotinib še močnejše vplivajo na nekontrolirano-konstitutivno kinazno aktivnost Bcr-Abl1, ki sicer povzroči aktivacijo številnih distalnih signalnih poti, vključno z JAK/STAT potmi. V omenjeni študiji so z uporabo masne citometrije v CD34+CD38visoko+ populaciji progenitorjev pri bolnikih s KML v kronični fazi kmalu po začetku zdravljenja z nilotinibom ugotovili znižanje bazalne fosforilacije Abl1. Nasprotno pa je bila fosforilacija proteina STAT3 celo statistično značilno zvišana. Spremembe signalizacije v času med postavitvijo diagnoze in 7 dni po začetku zdravljenja so bile različne v skupinah bolnikov, ki sta se razlikovali glede na molekularni odgovor – znižanje transkripta BCR-ABL1 merjenega na mednarodni skali (BCR-ABL1<sup>IS</sup>) po 3 in 6 mesecih (11).

Ob specifičnem delovanju TKI na BCR-ABL1 so pomembni tudi ne-tarčni - multikinazni inhibitorni učinki na normalno hematopoezo. Znižanja koncentracij T limfocitov v krvi bolnikov s KML zdravljenih z IM so nedavno razložili z njegovim vplivom na signalizacijo homeostatskega citokina IL-7 (13). TKI se razlikujejo po svojih učinkih na subpopulacijo CD4+ regulatornih T limfocitov (Treg), ki poleg CD25 izraža značilni transkripcijski faktor FOXP3 in zavira imunske odzive usmerjene tudi proti maligno spremenjenim celicam (14- 16). Treg so pri bolnikih s KML pred začetkom zdravljenja prisotni v višjih deležih, znižanja njihovih koncentracij po zdravljenju s TKI pa sledijo molekularnemu odgovoru bolnikov (14, 17). Za selektivno deplecijo Treg bi lahko bil odgovoren tudi omenjen inhibitorni učinek IM na signalizacijo IL-7 (13), ki jo lahko analiziramo s pretočno citometrijo in uporabo protiteles, usmerjenih proti fosforilirani obliki STAT5 (Tirozin 694). Takšna analiza pokaže nižje nivoje fosforilacije v CD4+ T limfocitih po inkubaciji z IM. V odzivu na stimulacijo z različnimi dozami IL-7 pa lahko ugotovimo tudi nižjo fosforilacijo STAT5 v Treg glede na ostale-konvencionalne CD4+ T limfocite (Slika 1).



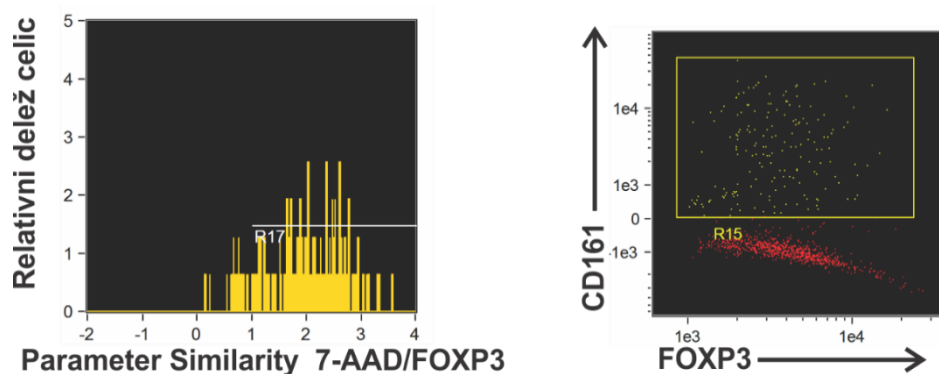
**Slika 1. Fosforilacija STAT5 (pSTAT5) v CD4+ T limfocitih po inkubaciji z IM in stimulaciji z IL-7.** Levo zgoraj je prikazan reprezentativni histogram pSTAT5 v zamejenih CD4+ T limfocitih polne krvi po stimulaciji z rekombinantnim IL-7 (2,5 ng/mL 15 minut) z oz. brez predhodne inkubacije z IM (3 $\mu$ M 60 minut) v primerjavi z nestimuliranimi celicami (PBS). Desno zgoraj je prikazano zamejevanje CD25+FOXP3+ Treg med CD4+ T limfociti. Levo spodaj so reprezentativni histogrami pSTAT5 v zamejeni CD25+FOXP3+ populaciji (rdeče) in ostalih – konvencionalnih CD4+ T limfocitih (sivo) po predhodni inkubaciji z IM in stimulaciji z različnimi koncentracijami IL-7. Desno spodaj je prikazan graf odvisnosti mediane intenzitete fluorescence (MFI) pSTAT5 od koncentracije IL-7. Ugotovili smo, da v primerjavi z ostalimi CD4+ T limfociti populacija CD25+FOXP3+ Treg kaže značilno nižje vrednosti pSTAT5 MFI po stimulaciji z različnimi koncentracijami IL-7 (n=6, Wilcoxon signed-rank test \*p<0.05, NZ=neznačilno).

Aberantno aktivnost v JAK/STAT poteh povezujejo z razvojem različnih sistemskih avtoimunskih bolezni. Opredelitvi pomena JAK kinaz v patogenezi sistemskih vezivno-tkivnih bolezni je sledila uvedba njihovih farmakoloških inhibitorjev v zdravljenje revmatoidnega artritisa (RA) (18). Tako je tudi pri sistemskih avtoimunskih boleznih, kot sta RA in sistemski lupus eritematosus (SLE) pomembno opredeliti razlike v JAK/STAT signalizaciji med patogenimi – konvencionalnimi CD4+ T limfociti in potencialno terapevtskimi Treg, ki zavirajo avtoimunske odzive (15).

Omenjene metode fosfo-specifične citometrije omogočajo direktno analizo vzorcev polne krvi in ne zahtevajo niti izolacije mononuklearnih celic, niti sortiranja celic. Izolacija odstrani celice iz naravnega okolja, ki v primeru polne krvi vključuje plazemske proteine-tudi citokine. S pristopi, ki omogočajo analizo polne krvi, je možno opredeliti razlike v bazalni fosforilaciji-aktivaciji STAT proteinov med subpopulacijami limfocitov v vzorcih bolnikov.



Na ta način smo lahko poleg zvišane ekspresije celokupnega STAT1 proteina, ki je bila povezana z aktivnostjo bolezni in porušeno homeostazo aktiviranih Treg (aTreg), ugotavljali tudi značilne razlike v bazalni fosforilaciji STAT5 CD4<sup>+</sup> T limfocitov bolnikov s SLE (19,20). S spremljanjem bolnikov smo lahko tudi ugotovili, da so od IL-7 odvisne razlike v fosforilaciji STAT5 med aTreg in konvencionalnimi CD4<sup>+</sup> T limfociti povezane s pogostejšimi poslabšanji in težjim potekom bolezni (20).



**Slika 2. Jedrna lokalizacija FOXP3 transkripcijskega faktorja v CD161<sup>+</sup> subpopulaciji FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfocitov.** Levo zgoraj je prikazan reprezentativni histogram parametra Similarity (korelira sliko 7-AAD jedrnega barvila s FOXP3 signalom) v CD161<sup>+</sup> subpopulaciji, ki je bila zamejena med FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfociti, kot je prikazano na razsevnom diagramu desno zgoraj. Višja ko je vrednost parametra Similarity, več jedrne lokalizacije FOXP3 je vidne na reprezentativnih slikah zamejenih celic prikazanih spodaj. Celice smo obarvali z jedrnim barvilom 7-AAD (rdeče), protitelesom usmerjenim proti transkripcijskemu faktorju FOXP3 (zeleno) in površinskemu CD161 (modro).

Za analizo translokacije STAT transkripcijskih faktorjev iz citoplazme v jedro T limfocitov (19-21) smo uporabili slikovni pretočno citometrijo, ki omogoča s pomočjo vgrajenih kamer še vizualizacijo celic in hkratno kvantitativno slikovno analizo. Podobno kot s fluorescenčno mikroskopijo in slikovnimi tehnikami je zato možno hkrati opredeljevati še osnovno morfologijo analiziranih celic, njihovo subcelično strukturo – npr. lokalizacijo, ko-lokalizacijo fluorescenčno označenih molekul v celici in tudi njihovo translokacijo med citoplazmo in jedrom. Za razliko od pregleda manjšega števila celic pod fluorescenčnim mikroskopom in





statičnih slikovnih tehnik, slikovni pretočni citometer omogoča analizo zelo velikega števila celic, zamejevanje in večbarvne slikovne analize tudi na zelo redkih populacijah celic.

V nedavnih študijah so ugotovili, da je manjša subpopulacija FOXP3+ celic, ki izraža CD161, sposobna produkcije pro-inflamatornih citokinov (22). Poleg tega so ekspresijo FOXP3 opisali tudi v aktiviranih konvencionalnih CD4+ T limfocitih, pri katerih pa so ugotavljali citoplazemsko lokalizacijo FOXP3 (23). Z uporabo slikovne pretočne citometrije je možno tudi v CD161+ subpopulaciji ugotoviti jedrno lokalizacijo FOXP3, ki je predpogoj za funkcijo tega transkripcijskega faktorja (Slika 2).

S slikovno pretočno citometrijo so na ta način določali tudi citoplazemsko oz. jedrno lokalizacijo proteina NPM. Pri bolnikih z AML in mutacijo gena NPM1 so ugotovili značilno nižje vrednosti parametra Similarity, ki pomenijo citoplazemsko lokalizacijo NPM (24).

S pomočjo drugega parametra imenovanega Modulation, ki meri razlike v distribuciji intenzitete fluorescence v celici, so v blastih bolnikov z akutno promielocitno levkemijo (APL) opredelili difuzni vzorec barvanja jedrnega proteina PML (25). V kasnejši študiji so blaste APL ločevali še z določanjem PML teles na osnovi parametra Spot counting (26). Po trditvah avtorjev bi bila lahko metoda uporabna, seveda skupaj z morfologijo in konvencionalno pretočno citometrijo, v začetni-hitri diagnostiki APL. Za opredelitev klinične uporabnosti slikovne pretočne citometrije pri spremljanju bolnikov z APL in drugimi krvnimi boleznimi so seveda potrebne dodatne študije. Morda bi jo v prihodnosti lahko uporabljali tudi za detekcijo vsaj nekaterih citogenetskih sprememb v subpopulacijah levkocitov, saj so fluorescenčno in situ hibridizacijo v suspenziji (S-FISH) nedavno uspešno združili z določanjem površinskih označevalcev v t.i. Immuno-S-FISH metodi (27).

## Literatura

1. Levine JH, Simonds EF, Bendall SC et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell*. 2015 Jul 2;162(1):184-97.
2. Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000; 100: 113–27.
3. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355–65.
4. Holroyd A, Cross NC, Macdonald DH. The two faces of myeloproliferative neoplasms: Molecular events underlying lymphoid transformation. *Leuk Res* 2011;35:1279-85.
5. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000; 95:19–29.
6. O'Shea JJ, Husa M, Li D et al. Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* 2004; 41: 727–37.
7. James C, Ugo V, Casadevall N et al. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med* 2005; 11: 546–54.
8. Myklebust JH, Brody J, Kohrt HE et al. Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling. *Blood* 2017;129:759-70.
9. Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 155–62.



10. Irish JM, Kotecha N, Nolan GP. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(2): 146–55.
11. Gullaksen SE, Skavland J, Gavasso S et al. Single cell immune profiling by mass cytometry of newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia treated with nilotinib. *Haematologica* 2017;102:1361-67.
12. Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002; 8 Suppl 4: 14–8.
13. Thiant S, Moutouou MM, Laflamme P et al. Imatinib mesylate inhibits STAT5 phosphorylation in response to IL-7 and promotes T cell lymphopenia in chronic myelogenous leukemia patients. *Blood Cancer J* 2017;7:e551.
14. Lu Z, Xu N, Zhou X et al. Therapeutic immune monitoring of CD4(+)CD25(+) T cells in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Oncol Lett.* 2017;14:1363-1372.
15. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-87
16. Bos PD. T(REG) Cells in Cancer: Beyond Classical Immunological Control. *Immunol Invest* 2016;19:1-8.
17. Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White DL, Hughes TP, Yong AS. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood* 2017;129:1166-76.
18. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 2015; 66: 311–28
19. Goropevšek A, Gorenjak M, Gradišnik S et al. Increased Levels of STAT1 Protein in Blood CD4 T Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients Are Associated with Perturbed Homeostasis of Activated CD45RA(-)FOXP3(hi) Regulatory Subset and Follow-Up Disease Severity. *J Interferon Cytokine Res* 2017;37:254-68
20. Goropevšek A, Gorenjak M, Gradišnik S et al. STAT5 phosphorylation in CD4 T cells from patients with SLE is related to changes in their subsets and follow-up disease severity. *J Leukoc Biol* 2017;101:1405-18.
21. Goropevšek A, Holcar M, Avčin T. The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017; 52:164-81.
22. Pesenacker AM, Bending D, Ursu S, Wu Q, Nistala K, Wedderburn LR. CD161 defines the subset of FoxP3+ T cells capable of producing proinflammatory cytokines. *Blood* 2013; 121: 2647-58.
23. Magg T, Mannert J, Ellwart JW, Schmid I, Albert MH. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol* 2012; 42: 1627-38.
24. Grimwade L, Gudgin E, Bloxham D et al. Detection of cytoplasmic nucleophosmin expression by imaging flow cytometry. *Cytometry A* 2012;81:896-900
25. Grimwade L, Gudgin E, Bloxham D, et al. PML protein analysis using imaging flow cytometry. *J Clin Pathol* 2011;64:447-50.
26. Mirabelli P, Scalia G, Pascariello C, D'Alessio F et al. ImageStream promyelocytic leukemia protein immunolocalization: in search of promyelocytic leukemia cells. *Cytometry A.* 2012;81(3):232-7.
27. Fuller KA, Bennett S, Hui H, Chakera A, Erber WN. Development of a robust immuno-S-FISH protocol using imaging flow cytometry. *Cytometry A.* 2016;89:720-30.



## Imunofenotipizacija levkemij in limfomov - zgodovina in sedanja praksa na KOH

Darja Žontar

*Specializirani hematološki Laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

Akutne levkemije in limfomi so heterogena skupina malignih bolezni z različnimi kliničnimi, morfološkimi, imunološkimi in genetskimi značilnostmi. Njihova diagnostika in opredelitev je dolgo temeljila na morfoloških in citokemičnih lastnostih celic in kombinaciji kliničnih znakov. Čeprav je citološki pregled še vedno prva preiskava, ki jo opravimo, je dostikrat subjektivna in so zato za natančno opredelitev malignoma nujne imunofenotipizacija celic ter citogenetske in molekularno genetske preiskave, na čemer temelji tudi nova razvrstitev Svetovne zdravstvene organizacije (WHO). Natančna opredelitev bolezni omogoča izbiro specifičnega zdravljenja in napoveduje potek bolezni, pri čemer igra pomembno vlogo imunofenotipizacija malignih celic s pretočno citometrijo.

V preteklih štiridesetih letih smo bili priče spektakularnemu razvoju instrumentov, ki pri celičnih analizah uporabljajo lasersko tehnologijo in pretok celic. Ta napredek v tehnologiji in razvoj novih analitičnih metod sta zagotovila hiter napredek v biologiji in medicini. Brez pretočne citometrije bi mnogih temeljnih odkritij v imunologiji ne bilo. Multiparametrični pristop je še povečal možnosti natančnejših analiz. Leta 1967 je bila prvič uporabljena fluorescenčna pretočna citometrija. Pravo revolucionarno odkritje so bila leta 1975 monoklonalna protitelesa, ki so omogočala natančno opredelitev celičnih linij in stopnje zrelosti celic. Že dve leti pozneje je bila prvič uporabljena dvobarvna tehnika označevanja celic.

V Specializiranem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo smo z določanjem imunoloških označevalcev začeli na fluorescenčnem mikroskopu. Leta 1990 smo dobili prvi pretočni citometer, ki je omogočal odčitavanje dveh fluorokromov hkrati. Večino naših preiskav je že v začetku predstavljala imunofenotipizacija levkemij in limfomov, vzorci so prihajali iz cele države. Nabor protiteles je neprestano naraščal, če smo sprva imeli na razpolago le 18 protiteles, jih danes uporabljamo že preko 90. Tudi postopki označevanja z novimi linijami monoklonskih protiteles so postajali vse bolj enostavni.

V času naših začetkov je bila literatura s področja pretočne citometrije težje dostopna kot danes, zato so bila nujna dodatna praktična izpopolnjevanja. V prvih letih je praktične delavnice organizirala in vodila dr. Ana Thews na Hematološki kliniki v Mainzu. Kasneje so se pojavila evropska združenja za pretočno citometrijo, sprva leta 1996 EWGCCA (European Working Group for Clinical Cell Analysis), ki je leta 2007 v sodelovanju z Eurostandard/UK-NEQAS (Sheffield, UK) prerasla v ESCCA (European Society for Clinical Cell Analysis) in vsako leto ponuja učne delavnice in konferenco s različnih področij pretočne citometrije.



Leta 1998 smo z novim pretočnim citometrom prešli na štiribarvno analizo vzorcev, kar je omogočilo bistveno več informacij hkrati, pretočna citometrija pa je postajala vse bolj zanimiva. Leta 2006 smo prešli na petbarvno pretočno citometrijo in leta 2016 na desetbarvno analizo, kar omogoča tudi analizo vzorcev, kjer je celic zelo malo.

Imunološke označevalce določamo v tkivu, kjer so prisotne maligne celice: v punktatu kostnega mozga, venski krvi, punktatu bezgavk, biopsijskih vzorcih, likvorju, plevralnem punktatu ali ascitesu. Iz vzorcev odvzetih s K-EDTA, pred označevanjem izoliramo levkocite tako, da odstranimo eritrocite. Sprva smo v ta namen uporabljali gradientno centrifugiranje preko fikola, ki pa je bilo zamudno in izkazalo se je celo, da z njim lahko izgubimo nekatere celične populacije, na primer T-pomagalko. Zato smo ga nadomestili z lizo eritrocitov z amonijevim kloridom. Celično suspenzijo uravnamo na primerno koncentracijo ( $15-20 \times 10^9/L$ ) in jo nato v posameznih epruveh označimo z izbrano kombinacijo protiteles z različnimi fluorescenčnimi barvili. Sledi 15 minutna inkubacija v temi in analiza na pretočnem citometru. Za dokaz imunoloških označevalcev v citoplazmi ali jedru celice je postopek nekoliko drugačen. Najprej vežemo površinska protitelesa, nato celice fiksiramo, sledi permeabilizacija membrane in šele nato dodamo protitelesa, ki jih želimo dokazati v citoplazmi. Sprva so bila številna monoklonalna protitelesa še nekonjugirana s fluorokromi in je bila potrebna dvostopenjska metoda označevanja: najprej inkubacija s primarnim protitelesom, spiranje nevezanega protitelesa, nato inkubacija s sekundarnim protitelesom s flourokromom in ponovno končno spiranje, kar je vzelo precej časa. Postopki označevanja z novimi linijami monoklonskih protiteles so postali bistveno bolj enostavni in krajši. Z novimi tehnikami opredelitve celičnih populacij, predvsem z uporabo CD45, ki izloči trombocite in razpadle celice, tudi izotipske kontrole za ločbo med negativnimi in pozitivnimi populacijami niso več potrebne.

Pri imunofenotipizaciji akutnih levkemij uporabljamo panele protiteles. S primarnim panelom določimo celično linijo, nato pa z izbranim sekundarnim panelom opredelimo še stopnjo dozorevanja celic. V primarni panel so vključeni membranski in citoplazemski označevalci: za mieloično vrsto CD13, CD14, CD33, mieloperoksidaza in HLA-DR, za limfatično vrsto pa označevalci za B-linijo CD10, CD19, TdT in citoplazemski CD79a in za T-linijo CD2, CD3, CD7, CD56 in citoplazemski CD3. CD34 je označevalec za nezrele celice in je lahko prisoten na vseh celičnih linijah. CD45 uporabimo v vsaki epruveli za identifikacijo celičnih populacij v točkovnem diagramu. Rezultat primarnega panela nas vodi k izboru sekundarnega; za mieloično vrsto določimo še označevalca dozorevanja CD15 in CD65, CD4 in CD64 za monocite, CD34 in CD117 za nezrele celice, CD41 in CD61 za megakarioblaste in CD56, CD4 in CD3 za morebitno redko levkemijo dendritičnih celic. Sekundarni panel za B-limfoblastno levkemijo obsega CD10, CD20, CD22, CD25, CD38, CD58, CD90, citoplazemski IgM in lahki verigi kapa in lambda. Za T-limfoblastno levkemijo dodatno določimo še CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD34, CD38, CD56 ter T-celične receptorje  $\alpha\beta$  in  $\gamma\delta$ . Izbor opisanih protiteles omogoča tudi prepoznavo redkih oblik levkemij in



morebitnih bifenotipskih levkemij in prisotnost aberantnih imunofenotipov. Takrat vključimo še dodatna specifična protitelesa, ki jih sicer v osnovnih panelih ni.

Pri limfomih je postopek enak. Primarni panel vključuje označevalce CD5, CD10, CD19, CD20 in CD38 za B celično linijo in CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD56 za T limfocite in NK celice. V sekundarne panelu za B limfome dodatno določimo še CD11c, CD22, CD23, CD25, CD38, CD52, CD79b, CD103, lahki verigi imunoglobulinov kapo in lambda ter FMC7. Za T in NK limfome je sekundarni panel sestavljen iz protiteles CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD30, CD52, CD56, CD57 ter T-celičnih receptorjev  $\alpha\beta$  in  $\gamma\delta$ .

Poleg primarne diagnostike ob ugotovitvi bolezni pri akutnih levkemijah in malignih limfomih po zdravljenju ugotavljamo prisotnost minimalne preostale bolezni (MRD), ki sloni na predhodnih rezultatih imunofenotipizacije in je doslej temeljila predvsem na znanih aberantnih imunofenotipih.

V zadnjih letih je bilo razvitih veliko bioloških in imunoloških terapij, tarčnih zdravil, ki so usmerjena proti specifičnim antigenom na malignih celicah. Ta zdravila lahko povzročijo spremembo proteinskih struktur, kar vodi v zamaskiranje ali popolno izgubo epitopa in onemogoča sledenje MRD po ustaljeni metodi, zato predstavlja nove izzive v diagnostiki in spremljanju odgovora na zdravljenje.

## Literatura

1. Weir EG, Borowitz MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Sem Haematol* 2001; 2(38): 124-13
2. Dacie, Lewis. *Practical haematology*. 9<sup>th</sup> ed. London: Churchill-Livingstone, 2001:297-314
3. Stewart CC, Nicholson J. *Immunophenotyping*. New York: Wiley-Liss, 2000: 181-238
4. Gorczyca W. *Flow Cytometry in Neoplastic Hematology*. London: Taylor&Francis, 2006: 181-219
5. Bauer KD, Duque MD, Shankey TV. *Clinical Flow Cytometry. Principles and application*. Baltimore: Williams&Wilkins, 1993: 203-235
6. Sack U, Tarnok A, Rothe G. *Cellular Diagnostics. Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry*. Basel: Karger, 2009: 29-33



## Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – redka bolezen z veliko obrazi

Irena Preložnik Zupan

*Klinični oddelek za hematologijo*

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je redka oblika pridobljene hemolitične anemije zaradi napake v membrani eritrocitov, pa tudi trombocitov in granulocitov. Ime je dobila, ker je pri nekaterih bolnikih hemoliza hujša ponoči in ker poteka v zagonih. Več kot stoletje že fascinira hematologe po vsem svetu zaradi zapletene patofiziologije in tako raznolike klinične slike.

Značilno jo opredeljuje klasična triada kliničnih težav: (1) paroksizmalna intravaskularna hemoliza, (2) venske tromboze in (3) odpoved kostnega mozga s citopenijo. Gre za napredujočo in življenje ogrožajočo bolezen, ki pogosto vodi v končno okvaro organov in prezgodnjo smrt. Glavni vzrok smrti so tromboze in ledvična odpoved. Približno polovica bolnikov ima težave s pljučno hipertenzijo. Bolezen se lahko pojavi pri katerikoli starosti, srednja starost bolnikov je 30 let. Zaradi neznačilnih težav bolniki obiskujejo specialiste različnih strok, bolezen pa lahko dolgo ostaja neodkrita.

### **Pojavnost (incidenca) in razširjenost (prevalenca) bolezni**

Incidenca je ocenjena na 1-1,5 bolnika na milijon po svetu, na nekaterih področjih je lahko pogostejša. Tudi v Sloveniji smo ocenili incidenco skozi 10-letno obdobje (2005-2014) in našli 2,5 nova bolnika na leto, kar znese 1,3/ milijon. Od leta 2003 obstoji mednarodni register, kamor vpisujemo tudi slovenske bolnike. Do junija 2012 je bilo vpisanih 1610 bolnikov iz 25-ih držav, 92,5% iz Evrope in severne Amerike. Nekoliko pogostejša je pri ženskah (54%). Trombotični dogodki povezani s PNH so prisotni pri 30% bolnikov iz registra. PNH je redka pri otrocih, manifestira se v adolescenci.

Povprečno preživetje bolnikov s PNH je bilo v 90-ih letih 10 let, v zgodnjih 2000-ih letih je poraslo na >20 let. Od pričetka zdravljenja z ekulizumabom ocenjujejo, da je življenjska doba teh bolnikov lahko enaka pripadajoči zdravi populaciji. Bolniki s hemolitično obliko bolezni imajo boljšo prognozo kot bolniki, ki imajo sočasno bolezen kostnega mozga, kot je aplastična anemija.

### **Etiopatogeneza**

PNH je bolezen hematopoetične matične celice. Gre za nemaligno klonsko razrast ene ali več matičnih celic (posledično imamo lahko enega ali več klonov), ki so pridobile somatsko mutacijo gena PIG-A na



kromosomu X. Posledično so okvarjene vse celične vrste, ki izvirajo iz prizadete matične celice (eritrociti, granulociti, monociti, trombociti, limfociti).

Gen *PIG-A* je potreben za sintezo glikozil fosfatidil inozitola (GPI), nosilca, ki pripenja nekatere beljakovine na celične membrane. Prizadete hčerinske celice (eritrociti, granulociti, monociti, limfociti, trombociti) zato nimajo z GPI nosilcem pripetih določenih membranskih proteinov. Zlasti pomembni sta dve beljakovini v eritrocitni membrani (CD55 in CD59), ki zavirata aktivacijo komplemента. Njihova odsotnost pripelje do intravaskularne hemolize eritrocitov, povzročene s komplementom, kar je tudi osnova bolezni.

### Klinična slika

PNH običajno poteka kot kronična intravaskularna hemolitična anemija, ki je glavna in direktna posledica somatske mutacije. Anemija je lahko blaga in kronična, lahko pa nastopi akutno kot posledica hude hemolize. Temen urin (hemoglobinurijo) po spanju ima le malo bolnikov. Hudo hemolizo lahko sproži okužba, operacija ali transfuzija krvi. Posledica hemolize in kopičenja železa je tudi ledvična okvara. Pogoste so venske tromboze jetrnih in drugih ven v trebušni votlini ter drugje po telesu. Arterijske tromboze so redke. Tveganje za trombozo je povezano z velikostjo klona PNH. Zelo resen zaplet je tromboza jetrnih ven (Budd-Chiarijev sindrom). Ker gre za bolezen hematopoetične matične celice, pogosto najdemo poleg anemije še druge citopenije in v najslabšem primeru aplastično anemijo. PNH lahko napreduje tudi v enega od mielodisplastičnih sindromov ali akutno levkemijo.

Mednarodna interesna skupina PNH je razdelila bolnike s PNH v tri podskupine: (1) *klasična PNH* – hemolitična oblika s klonom PNH večjim kot 50%, brez druge spremembe v kostnem mozgu; (2) *PNH v sklopu druge bolezni* kostnega mozga (aplastična anemija, mielodisplastični sindrom, primarna mielofibroza) s kliničnimi simptomi / znaki hemolize; (3) *subklinična oblika PNH* z manjšo velikostjo klona PNH ter brez jasnih kliničnih ali laboratorijskih znakov hemolize.

### Diagnoza

Ob sumu na PNH je priporočljivo opraviti naslednje laboratorijske preiskave: celotna krvna slika z diferencialno krvno sliko, število retikulocitov za oceno delovanja kostnega mozga, parametre hemolize (direktni ter indirektni bilirubin, LDH, haptoglobin v serumu), pomembne so tudi zaloge železa. Zlati standard za diagnostiko PNH pa je v zadnjih letih postala specifična večparametrična pretočna citometrija. Pri Coombs-negativni hemolitični anemiji in s pretočno citometrijo potrjenem pomanjkanju antigenov značilnih za PNH na granulocitih v krvi potrdimo PNH. Ob sumu na dodatno motnjo v kostnem mozgu, zlasti ob citopenijah v krvi, je potrebno opraviti citološko ter histološko preiskavo kostnega mozga s citogenetiko.



Najbolj občutljiva in specifična je preiskava s pretočnim citometrom, s katero ugotovimo pomanjkanje beljakovin, ki so pritrjene na celično membrano eritrocitov, granulocitov ali monocitov z GPI nosilcem, npr. CD59, CD55 na eritrocitih in CD14 na granulocitih. Pomembna je zgodnja diagnoza, zato moramo biti pozorni in pomisliti na PNH ter opraviti testiranje pri vsakem bolniku z mielodisplastičnim sindromom in aplastično anemijo, nepojasnjeno trombozo, Coombs negativno hemolitično anemijo, okvaro organov in hemolizo.

### Zdravljenje

Je odvisno od oblike bolezni in prizadetosti bolnika. Do nedavnega sta bili edini možnosti zdravljenja bolnikov s PNH presaditev krvotvornih matičnih celic ter simptomatsko zdravljenje, ki je vključevalo transfuzije krvnih pripravkov, glukokortikoide in rastne dejavnike. Napredek v zdravljenju pomeni odkritje monoklonskega protitelesa ekulizumaba, ki se veže na C5 enoto komplementa, prepreči njegovo aktivacijo in s tem hemolizo celic. Na tržišču je od leta 2007. Učinkovito zmanjša oz. ustavi hemolizo povzročeno s komplementom, prepreči nastanek anemije in potrebo po transfuzijah. Zdravilo pomembno zmanjša tudi zaplete hemolize, kot so ledvična prizadetost in pljučna hipertenzija. Dokazano zmanjša trombotične zaplete. Simptomatično pri bolnikih z anemijo dodajamo po potrebi železo, folno kislino, včasih so potrebne transfuzije eritrocitov.

Pri obliki bolezni s prevladujočo odpovedjo kostnega mozga (aplastično anemijo ali mielodisplastičnim sindromom) in klonom PNH, ki je običajno majhen, se usmerimo v zdravljenje bolezni kostnega mozga po smernicah.

### Zaključek

Zgodnja ugotovitev PNH je ključna za učinkovito zdravljenje in večje preživetje bolnikov. Raznolikost simptomov in znakov, s katerimi se bolezen kaže, je glavni vzrok za zamudo v ugotavljanju ter zdravljenju bolezni. Kdaj je priporočljivo opraviti specifično diagnostiko s pretočno citometrijo, je opisano v spodnjem algoritmu.

KDAJ POMISLITI NA PNH?
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pridobljena hemolitična anemija in znaki hemolize (Coombsovi testi negativni)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Laboratorijski znaki intravaskularne hemolize (hemoglobinemija, hemoglobinurija, hemosiderinurija, zvečana raven LDH, zmanjšana vrednost plazemskega haptoglobina)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Citopenije (granulocitopenija in/ali trombocitopenijain/ali anemija) ob zvečanem številu retikulocitov ali znakih hemolize</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Nepojasnjene venske tromboze (predvsem abdominalnih ali cerebralnih ven)</li></ul>





- Aplastična anemija, mielodisplastični sindrom, predvsem ob kliničnih ali laboratorijskih znakih hemolize
- Epizodična disfagija ali abdominalna bolečina z znaki hemolize



**Izključi/potrdi klon PNH z visoko specifično pretočno citometrijo**

Specialistični hematološki laboratorij KOH, UKC Ljubljana

Odvzem venske krvi, epruveto z EDTA (5 ml), pošiljaj pri sobni temperaturi, do 24 ur od odvzema.

**Literatura**

1. Hill A, DeZern AZ, Kinoshita T, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Nat Rev 2017; 3: 1-14.
2. Preložnik Zupan I. Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – prve izkušnje zdravljenja z ekulizumabom pri slovenskih bolnikih. Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-113–9.
3. Hauptman J, Žontar D, Preložnik Zupan I. Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – pregled populacije bolnikov v Sloveniji. Zdrav Vestn 2016; 85: 383–92.



## Določanje klona paroksizmalne nočne hemoglobinurije - PNH

Tadej Furlan

*Specializirani hematološki Laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

### Uvod

Ker so PNH napačno uvrščali med hemolitične anemije, so se diagnostični postopki prvotno osredotočali na preiskave eritrocitov. Šele z razvojem večbarvne pretočne citometrije so raziskovalci začeli tudi z analizo levkocitov. Sedaj analiza s pretočno citometrijo velja za zlati standard pri postavitvi diagnoze in kasnejšemu spremljanju klona PNH. Ker je bolezen zelo redka in je bilo težko zbrati dovoljšnje število bolnikov, se je standardizacija postopka določanja klona PNH s pretočno citometrijo pričela šele pred slabimi 10-imi leti. Dodatni problem standardizacije je tudi ta, da na tržišču obstaja veliko različnih monoklonskih protiteles proti številnim z glikozil fosfatidil inozitolnim (GPI) nosilcem pripetih proteinom. S programom zunanje kontrole kakovosti so ugotovili, da niso vsa monoklonska protitelesa enako učinkovita pri zaznavanju klona PNH. Dolgo sta se tako za določanje klona PNH na granulocitih uporabljali protitelesi proti CD55 in CD59. Številne študije so pokazale, da obstajajo druga monoklonska protitelesa, ki so veliko bolj specifična. Nadalje so ugotovili, da obstajajo razlike v zaznavanju zelo majhnih klonov PNH. Čeprav so laboratoriji z uporabo določenih reagentov brez težav določili velike klone PNH, so se ti izkazali za neustrezno občutljive pri zaznavanju klonov PNH manjših od 1% levkocitov (4).

Revolucijo pri določanju klona PNH je prineslo odkritje fluorescenčnega aerolizina (FLAER). FLAER je neaktivna oblika bakterijskega protein aerolizina, na katerega je vezan fluorokrom. Ta protein se specifično veže na nosilec GPI in tako omogoča zanesljivo zaznavanje klona PNH (5).

V laboratoriju se pri diagnostiki PNH analizira levkocite. V primeru pozitivnega rezultata pa še eritrocite. Glavni cilj analize eritrocitov je prepoznavanje in kvantifikacija populacije eritrocitov s pomanjkljivim izražanjem na GPI vezanih proteinov (Tip III) ter njihovo razlikovanje od normalnih eritrocitov (Tip I). Poleg omenjenih dveh podvrst so pri bolnikih s PNH običajno prisotni tudi eritrociti z delnim izražanjem na GPI vezanih proteinov (Tip II). Pri prepoznavanju in spremljanju klona PNH ne zadošča zgolj preiskava eritrocitov, ker lahko lažno znižane vrednosti PNH klona dobimo zaradi hemolize eritrocitov, ki spremlja bolezen oziroma zaradi prejetih transfuzij. Zato je potrebno analizirati tudi levkocite, da dobimo podatek o velikosti klona tako na levkocitih kot eritrocitih, ki je klinično pomemben (3).

Analiza levkocitov je najboljši način določanja resnične velikosti klona PNH. Limfociti zaradi dolge življenjske dobe in variabilnosti v izražanju GPI vezanih proteinov niso primerna populacija za določanje



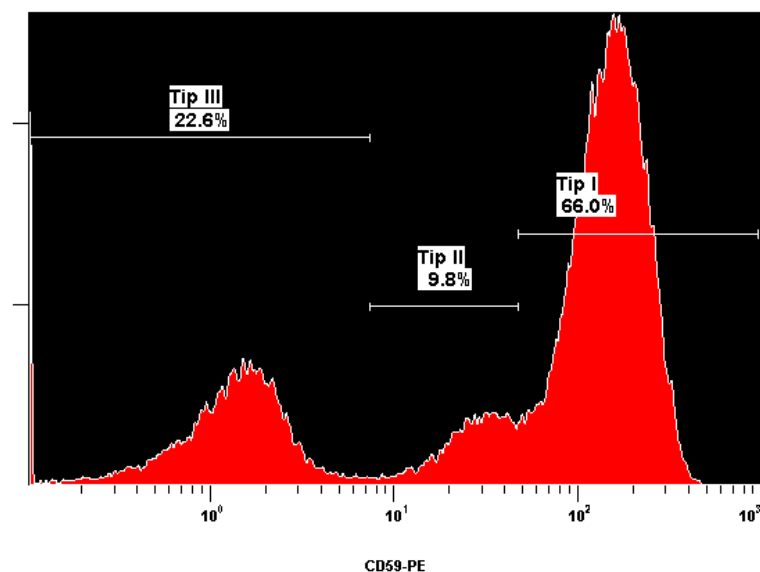
klona PNH. Klon PNH se zato določa na populaciji monocitov in nevtrofilnih granulocitov. Večinoma sta velikosti klona na monocitih in nevtrofilnih granulocitih primerljivi. Dobra stran analize obeh populacij je tudi ta, da služi za notranjo kontrolo kakovosti. Če določimo klon PNH samo na eni vrsti, na drugi pa ne, vemo da je potrebno preiskavo ponoviti.

### Določanje klona PNH s pomočjo pretočne citometrije

Za zaznavanje klona PNH je potrebno analizirati vensko kri odvzeto z antikoagulantom EDTA ali heparin. Kostnega mozga zaradi številnih nezrelih celic v njem ne analiziramo (5). Ko odvezamo vzorec za analizo klona PNH, ga je potrebno analizirati v roku 48-ih ur, idealno pa v roku 24-ih ur. Stabilnost klona PNH po več kot 48-ih urah od odvzema vzorca je vprašljiva (1).

### Določanje klona na eritrocitih

Pri pripravi eritrocitov je potrebna previdnost, saj radi tvorijo skupke. Zaželeno je, da se najprej eritrocite inkubira z monoklonskimi protitelesi, temu sledi večkratno spiranje. Večkratno spiranje odstrani nevezana protitelesa, kar zmanjša možnost njihove nespecifične vezave in prepreči agregacijo eritrocitov. Tako lažje ločimo med podvrstami klona PNH na eritrocitih (tip II in tip III). Poleg spiranja uporabljamo še redčitev protiteles in močno premešavanje vzorca (1).



Slika 1: Določanje klona PNH (tip II in III) na CD235a pozitivnih eritrocitih s protitelesi proti CD59. Normalni eritrociti so tip I.

V rutinski analizi s pretočnim citometrom se eritrocite najprej zameji glede na prednje (FSC) in stransko (SSC) sipanje svetlobe. Na ta način ločimo eritrocite od razpadlih trombocitov ter skupkov eritrocitov. Analizirali naj bi vsaj 50 000 celic. Klon PNH lahko zaznamo že samo z uporabo posameznih protiteles proti CD55 ali CD59. Študije so pokazale, da je bolje uporabiti protitelesa proti CD59, ker zgolj z uporabo



protiteles proti CD55 težje ločimo med Tipom II in III (Slika 1). Če uporabljamo protitelo proti CD59, je kot fluorokrom najbolje uporabljati fikoeritrin (PE), s čimer dodatno zmanjšamo agregacijo eritrocitov (1). Čeprav se lahko uporablja le eno protitelo, je priporočljivo da se poleg anti CD59 uporablja tudi protitelesa proti glikoforinu A (CD235a). Glikoforin A je transmembranski protein, ki je prisoten na eritrocitih. Z uporabo protitelesa proti CD235a lažje ločujemo eritrocite od ostalih celic. Uporaben pa je tudi kot pozitivna kontrola, saj je prisoten tako na normalnih eritrocitih kot tudi na klonu PNH (Tip II in Tip III). Ker tudi protitelesa proti CD235a povzročajo agregacijo eritrocitov, jih je potrebno pred inkubacijo redčiti s pufrom (PBS). CD235a v kombinaciji s PE povzroča močnejšo agregacijo kot pa vezan na fluorescein izotiocianat (FITC) (3).

### Določanje klona PNH na levkocitih

Vzorec za analizo levkocitov pripravimo tako, da vensko kri najprej inkubiramo s protitelesi, nato pa sledi liza eritrocitov (1).

Doslej je bilo opisanih že veliko monoklonskih protiteles, ki so uporabna pri določanju klona PNH na nevtrofilnih granulocitih. Desetletje nazaj sta se tako kot pri eritrocitih uporabljali protitelesa proti CD55 in CD59, vendar je bila ločba med pozitivno in negativno populacijo celic zelo težka. Z uporabo teh dveh protiteles je bilo sipanje rezultatov (CV) bistveno večje, velikost klona PNH pa manjša kot pri uporabi protiteles proti CD16 ali CD66b (1). Zelo dobre rezultate je dala kombinacija protiteles proti CD16, CD66b in CD24. Pri določanju CD16 se lahko pojavi težava, ker se pri mielodisplaziji ne izraža na eozinofilnih in na granulocitih. Poleg tega obstaja več variant CD16, ki jih določena protitelesa proti CD16 ne prepoznajo. Zato protitelesa proti CD16 vedno uporabljamo v kombinaciji z drugim protitelesom.

Pri monocitih se kot linijski označevalec uporablja CD14.

Pri določanju klona PNH na monocitih in nevtrofilnih granulocitih poleg linijskih označevalcev uporabljamo tudi FLAER. Pri analizi iščemo klon PNH kot dvojno negativno populacijo celic. Klon PNH na monocitni membrani ne izraža FLAER in CD14 (CD14<sup>+</sup>/FLAER<sup>-</sup>), na membrani nevtrofilnih granulocitov pa ne izraža CD16, CD24, CD66b in FLAER (FLAER<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> ali CD24<sup>-</sup> ali CD66b<sup>-</sup>) (Slika 2 in 3).

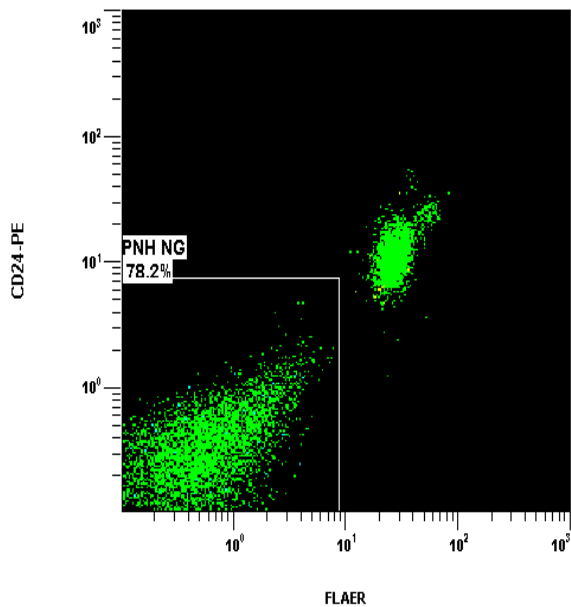
S pretočnim citometrom je potrebno analizirati vsaj 50 000 levkocitov (1).

### Zaključek

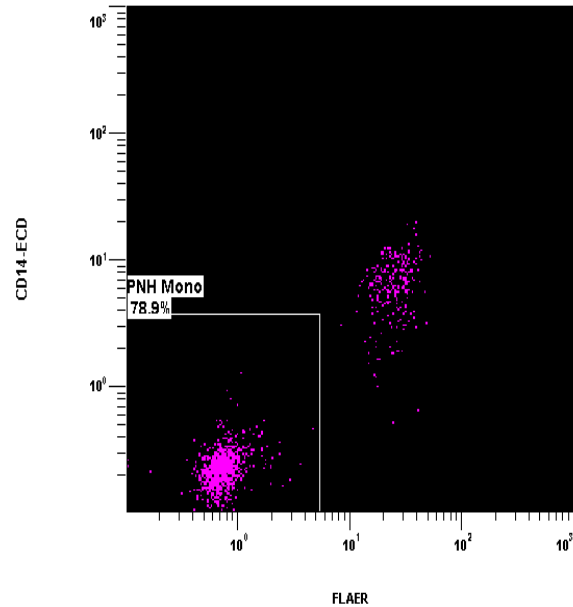
Ker je PNH redka bolezen, sta presejanje potencialnih bolnikov in pravilna postavitve diagnoze zelo pomembni. PNH je kronična bolezen, ki lahko traja vse življenje in ima velik vpliv na kvaliteto življenja, pri nekaterih pa tudi na možnost preživetja. Ker bolnike s klonom PNH spremljamo vse življenje, je pomembno, da laboratorij uporablja validirani protokol in pravilno uravnan pretočni citometer. Prav tako je ključno, da ima usposobljen laboratorijski kader in da sodeluje v zunanji kontroli kakovosti. S



protokolom, ki ga uporablja naš laboratorij, je meja zaznave klona PNH 0,01%. Čeprav je določanje klona PNH s pretočno citometrijo postala rutinska metoda, ostaja še veliko nerešenih težav. Ena od njih je npr. mielodisplastični sindrom (MDS). Če se pri MDS pojavijo nezrele celice v venski krvi, vzorca krvi ne moremo analizirati, čeprav je določitev klona PNH pri teh bolnikih pomembna.



Slika 2: Dvojno negativni klon PNH (FLAER<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) na nevtrofilnih granulocitih



Slika 3: Dvojno negativni klon PNH na monocitih (CD14<sup>-</sup>/FLAER<sup>+</sup>)

## Literatura

1. Borowitz MJ, Sutherland DR, Illingworth AJ, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B* 2010;78B:211-230
2. Bessler M, Mason PJ, et al. Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1994;87:863-866
3. Sutherland DR, Kuek N, et al. Use of FLAER based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132:564-572
4. Richards SJ, Whitby L, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B* 2008;76B:47-55
5. Wang SA, Pozdynakova O et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow disease, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009;94:29-37



## Plazmocitom: postavitve diagnoze in določanje minimalne preostale bolezni

Katarina Reberšek

*Specializirani hematološki Laboratorij, Klinični oddelek za hematologijo, UKC Ljubljana*

Plazmocitom je maligna novotvorba, za katero je značilno razraščanje plazmocitomskih celic v kostnem mozgu (KM). Plazmocitomske celice proizvajajo monoklonski imunoglobulin določenega razreda. Če plazmocitomske celice izločajo monoklonski imunoglobulin razreda A, D ali G, govorimo o plazmocitomu IgA, IgD ali IgG. Če plazmocitomske celice izločajo samo lahke verige, govorimo o Bence-Jonesovi vrsti plazmocitoma, če pa monoklonskega imunoglobulina ne izločajo, govorimo o nesekretornem plazmocitomu. Plazmocitom predstavlja 1% vseh rakavih obolenj in 10% vseh krvnih bolezni ter je tako za kronično limfatično levkemijo (KLL) drugo najpogostejše krvno rakavo obolenje. Približno 4 ljudje na 100 000 prebivalcev letno zbolijo za plazmocitomom. Mediana starosti ob diagnozi je 70 let, gre torej za bolezen starejših ljudi in je pogostejša med moškimi. Kljub pojavu novih učinkovin za zdravljenje plazmocitoma in boljšemu razumevanju same patogeneze, je plazmocitom še zmeraj neozdravljiva bolezen [1, 2].

Rentgenska slika prsnega koša in kosti pokaže litične lezije ali difuzno osteopenijo. S pomočjo MRI lahko določimo obseg infiltracije KM in stisk hrbtenjače pri bolnikih z bolečinami. Krvna slika lahko pokaže anemijo, pospešena je lahko sedimentacija eritrocitov. Povišani so lahko tudi serumski kalcij, sečna kislina, kreatinin in sečnina. Elektroforeza beljakovin v serumu in urinu lahko pokaže prisotnost monoklonskega imunoglobulina. Razred imunoglobulina in vrsto lahkih verig določimo z imunoelektroforezo. Serumski  $\beta_2$ -mikroglobulin ( $\beta_2M$ ) je eden najmočnejših napovednih dejavnikov poteka bolezni [2, 3].

Poleg citogenetskih in molekularno-genetskih preiskav pretočna citometrija igra eno glavnih vlog pri postavitvi diagnoze in klasifikaciji hematoloških rakavih bolezni. Zadnje desetletje je bila imunofenotipizacija plazmocitoma deležna obsežnih raziskav. Kljub temu v literaturi obstajajo nesoglasja o dejanskem imunofenotipu plazmocitomskih celic. Ta so posledica metodoloških napak, in sicer zaradi uporabe različnih panelov protiteles, s katerim določamo imunofenotip. Na voljo je namreč več panelov, poleg tega se za isti označevalec uporablja drugačen klon protiteles in drugačen fluorokrom. Prav tako k različnim rezultatom prispeva uporaba različnih laserjev, konfiguracija optičnih in fluorescenčnih detektorjev v različnih pretočnih citometrih, uporaba različnih antikoagulantov, uporaba različnih reagentov in postopkov priprave vzorcev, različno število analiziranih celic ter pristop k analizi podatkov in



interpretacija [4-6]. Poleg tega je analiza plazmatk v vzorcu KM izredno kompleksna zaradi njihovega praviloma majhnega deleža v primarnih vzorcih. To je posledica hemodilucije deloma zaradi otočkaste razrasti plazmocitomskih celic v KM in deloma zaradi večkratnega odvzema za sočasne preiskave, ki prav tako zahtevajo vzorec KM [7-11]. Dodatno oviro predstavlja heterogenost izražanja antigenov na različnih plazmatkah in dejstvo, da plazmatke izgubijo večino označevalcev, značilnih za vrsto B. Imunofenotipizacija plazmatk zahteva uporabo dvoje vrst protiteles, in sicer protitelesa za identifikacijo in protitelesa za nadaljnjo karakterizacijo plazmatk [9]. V preteklosti so plazmocitomske celice identificirali na osnovi močnega izražanja CD38 in negativnega oziroma šibko izraženega CD45 [12, 13]. S kombinacijo protiteles usmerjenih proti antigenoma CD38/CD45 lahko spregledamo plazmocitomske celice, ki izražajo antigen CD45. Antigen CD38 je na plazmocitomskih celicah izražen v manjši meri kot na poliklonalnih plazmatkah. Poleg tega je antigen CD38 izražen tudi na drugih hematopoetskih celicah in tako ni specifični označevalec plazmocitomskih celic [14]. Plazmatke značilno izražajo antigen CD138. Vendar je antigen CD138 lahko na plazmocitomskih celicah le šibko izražen in prisoten tudi na ne-hematopoetskih celicah [9]. Literatura sicer navaja različno občutljivost zaznave antigena CD138, kar najverjetneje predstavlja metodološki problem. Izguba antigena CD138 je bila povezana s shranjevanjem na hladnem (hladilnik). Izražanje se lahko zmanjša tudi pri liziranih vzorcih, ki pred analizo stojijo čez noč. Prav tako lahko predstavljajo problem različni postopki za liziranje eritrocitov, pri čemer največjo izgubo CD138 povzroči izolacija celic preko fikola. Uporaba raztopine za lizo eritrocitov (FACS Lyse®) tudi lahko v določenih primerih povzroči izgubo antigena CD138. Uporaba raztopine amonijevega klorida ni povzročila izgube CD138 ne pri nas in ne pri drugih [14]. Tako kombinacija protiteles (CD38 in CD138), ki so usmerjena proti obema antigenoma, predstavlja bolj učinkovit pristop k identifikaciji plazmatk [7, 9]. Ob postavitvi diagnoze pri večini bolnikov s plazmocitomom zasledimo aberantni imunofenotip (87%), ki je lahko v pomoč pri končni postavitvi diagnoze in dodatno pri spremljanju merljivega preostanka bolezni (MPB) [14].

Ker lahko z uporabo pretočne citometrije v kompleksnem vzorcu, kot je kri ali kostni mozeg, prepoznamo in preštejemo celice, ki pripadajo določeni subpopulaciji, jo lahko uporabimo tudi pri spremljanju MPB. Spremljanje MPB pri plazmocitomu s pretočno citometrijo literatura navaja kot zanesljivo, saj jo lahko uporabimo praktično pri vsakem bolniku. Poleg tega poda rezultate z visoko občutljivostjo in specifičnostjo ter zagotovi rezultate hitro in ob primerni ceni. Vendar so rezultati odvisni od že omenjenih dejavnikov, ki vplivajo na določitev imunofenotipa ob diagnozi [4-6]. Glede na to, da se imunofenotip plazmocitomskih celic lahko med zdravljenjem spreminja, je za spremljanje MPB potreben širok nabor protiteles. Določanje MPB je sicer zelo pomembno zaradi spremljanja zdravljenja in določitve ocene tveganja napredovanja bolezni. Pokazali so, da imajo bolniki, pri katerih s pomočjo pretočne citometrije po avtologni PKMC niso zaznali preostalih plazmocitomskih celic, daljši čas preživetja v primerjavi z bolniki, pri katerih so zaznali



plazmocitomske celice. Dodatno so pokazali, da imajo bolniki, pri katerih pred avtologno PKMC niso zaznali preostalih plazmocitomskih celic, daljši čas preživetja v primerjavi z bolniki, pri katerih so plazmocitomske celice zaznali pred PKMC. Bolniki, ki imajo večji delež plazmocitomskih celic v primerjavi z normalnimi plazmatkami po avtologni PKMC, imajo krajši čas do ponovitve bolezni [15, 16].

Metoda imunofenotipizacije/spremljanja MPB s pretočno citometrijo pri plazmocitomu zaenkrat še ni standardizirana. Zato je ključnega pomena, da se laboratorij, ki vpeljuje protokol za imunofenotipizacijo/spremljanje MPB pri plazmocitomu, poslužuje validiranih panelov (npr. panel, ki ga predlaga EuroFlow Consortium). Z uporabo teh validiranih panelov so pokazali dobro ujemanje rezultatov med laboratoriji ter v okviru kliničnih študij pokazali povezavo z napovedjo poteka bolezni [4-6].

Ločevanje med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami lahko dosežemo z uporabo najmanj 6-barvne pretočne citometrije, v kolikor analiziramo zadostno število celic. Pri spremljanju MPB nam je v dodatno pomoč imunofenotip, ki ga pridobimo ob postavitvi diagnoze. Za imunofenotipizacijo/spremljanje MPB pri plazmocitomu je priporočena uporaba protiteles proti CD38, CD138, CD45, CD19, CD56, CD27, CD81 in CD117. V nejasnih in atipičnih primerih je priporočljiva tudi analiza citoplazemskih lahkih verig  $\kappa$  in  $\lambda$  ( $c_{\kappa}/c_{\lambda}$ ). V teh primerih je nujna sočasna analiza površinskih antigenov, da lahko primerjamo razmerje  $c_{\kappa}/c_{\lambda}$  v populaciji plazmocitomskih celic z razmerjem v populaciji normalnih plazmatk. Nobeno izmed uporabljenih protiteles ne loči zanesljivo med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami. Ločevanje med normalnimi in plazmocitomskimi celicami mora biti torej osnovano na multiparametrični analizi, to se pravi, da identifikacija plazmocitomskih celic ne sme biti osnovana na izražanju enega antigena, ampak na izražanju več antigenov hkrati. Vzrok je v tem, da večina antigenov, ki so nujno potrebni za ločevanje med normalnimi/reaktivnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami ter posledično za določitev aberantnega imunofenotipa, ni aberantno izraženih, ko gledamo izražanje samo enega antigena. Tako je na primer antigen CD19 odsoten pri večini bolnikov s plazmocitomom ter tako predstavlja enega najbolj uporabnih antigenov pri imunofenotipizaciji/MPB pri plazmocitomu, vendar je lahko odsoten pri približno 30% normalnih/reaktivnih plazmatk v kostnem mozgu. Prav tako smo dolgo mislili, da je izražen antigen CD56 specifični označevalec za plazmocitom, vendar je danes jasno, da okoli 6-9% normalnih/reaktivnih plazmatk v kostnem mozgu prav tako izraža CD56. Prav tako dodatne antigene, ki imajo značilen nivo izražanja pri plazmocitomu (CD28+, CD45-, CD81-/š, CD27-/š), lahko zaznamo tudi na normalnih plazmatkah v kostnem mozgu, in sicer CD28+ (15%) in CD45- (22%). Nasprotno pa do sedaj še niso zaznali normalnih plazmatk, ki bi izražale CD117. Najbolj pogosti imunofenotip normalnih plazmatk je: CD38+m, CD138+m, CD19+, CD45+, CD20-, CD27+, CD28-, CD56-, CD81+, CD117-, poliklonalno razmerje  $c_{\lambda}/c_{\kappa}$ . Manjše subpopulacije normalnih plazmatk (tipično <30% celotne populacije normalnih plazmatk) imajo manj tipičen antigenski profil: CD19-, CD45-/š, CD20+, CD27š, CD28+, CD56+.





kažejo imunofenotip, ki je sestavljen iz mnogih kombinacij izraženih antigenov: CD38š, CD19-, CD45-, CD20+, CD27-/š, CD28+, CD56+m, CD81-/š, CD117+, monoklonalnost c $\lambda$  ali c $\kappa$  [4-6].

MPB-negativen kostni mozeg v primernem kliničnem kontekstu imenujemo tudi imunofenotipski odgovor ("immunophenotypic response") ali F-CR («Flow-Complete Response»). Vendar je meja med MPB-pozitivnim in MPB-negativnim vzorcem lahko zelo različna ter se spreminja z razvojem tehnologij in zdravljenja. Čeprav večina laboratorijev izvaja analize MPB z nižjo mejo zaznave (0,001%/10<sup>-5</sup>), je trenutno kot klinično pomembna in rutinsko dosegljiva meja sprejeta 0,01%/10<sup>-4</sup>. Popolni izvid vključuje raven MPB, mejo zaznave in/ali spodnjo mejo kvantifikacije, odvisno od ravni MPB, ter celotno število analiziranih celic, potem ko izključimo debris. Podati moramo tudi odstotek in število plazmocitomskih celic in normalnih plazmatk (če so prisotne), ker ima to vpliv na napoved poteka bolezni in ker na razmerje med plazmocitomskimi celicami in normalnimi plazmatkami ne vpliva hemodilucija. Poleg tega moramo podati viabilnost celic in kvaliteto vzorca za oceno hemodilucije. Če je prisotna hemodilucija, ki jo označuje odsotnost normalnih plazmatk, predhodnikov celic B, mastocitov, eritroblastov in/ali mieloblastov, vzorec označimo kot nesprejemljivega za analizo, kar zabeležimo tudi v izvid. Literatura navaja, da ima način podajanja rezultatov (na vse jedrne celice oziroma na levkocite) in način lize eritrocitov najverjetneje zanemarljiv vpliv na raven MPB, vendar moramo kljub temu v izvid navesti uporabljen metodo. Podamo še imunofenotip plazmocitomskih celic in odstotek pozitivnih celic za vsak posamezen antigen [4-6].

## Literatura

1. San Miguel JF, Mateos M-V. Can multiple myeloma become a curable disease? *Haematologica* 2011;96(9):1246–8.
2. Černelč P. Diseminirani Plazmocitom. *Interna Med.* 4. ed. Ljubljana: Založba Littera Picta, d. o. o.; Slovensko medicinsko društvo; 2011. p. 1331–5.
3. Munshi NC, Longo DL, Anderson KC. Plasma Cell Disorders. *Harrisons Princ Intern Med.* 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 936–44.
4. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A et al. Consensus Guidelines for Myeloma Minimal residual Disease Sample Staining and Data Aquisition. *Cytometry Part B* 2016; 90B: 26-30.
5. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A et al. Consensus Guidelines on Plasma Cell Myeloma Minimal residual Disease Analysis and Reporting. *Cytometry Part B* 2016; 90B: 31-39.
6. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H et al. Immunophenotype of Normal vs. Myeloma Plasma Cells: Toward Antibody Panel Specifications for MRD Detection in Multiple Myeloma. *Cytometry part B* 2016; 90B: 61-72.
7. San Miguel JF, Gutiérrez NC, Mateo G, et al. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42(11):1510–9.
8. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of Plasma Cells in Bone Marrow Aspirates by Flow Cytometric Analysis Compared With Morphologic Assessment. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(6):951–5.
9. Mateo G, San Miguel JF, Matos A. Immunophenotyping of Plasma Cells in Multiple Myeloma. In: Brown R, Ho PJ, editors. *Mult Myeloma.* New Jersey: Humana Press; 2005. p. 5–24.



10. Paiva B, Vidriales M-B, Perez JJ, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009;94(11):1599–602.
11. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93(3):431–8.
12. Tai Y-T, Teoh G, Shima Y, et al. Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched populations. *J Immunol Methods* 2000;235(2):11–9.
13. Dingli D, Nowakowski GS, Dispenzieri A, et al. Flow cytometric detection of circulating myeloma cells before transplantation in patients with multiple myeloma: a simple risk stratification system. *Blood* 2006;107(8):3384–8.
14. Lin P, Owens R, Tricot G, et al. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004;121(4):482–8.
15. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, et al. Flow Cytometric Immunophenotyping and Minimal Residual Disease Analysis in Multiple Myeloma. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):728–32.
16. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(10):4017–23.



## ZAPISKI



## Sponzorji strokovnega srečanja



**Z VAMI ŽE 20 LET**





# DURACLONE

## RUO ANTIBODY PANELS

### ADVANCED FLOW CYTOMETRY SOLUTIONS FOR CLINICAL RESEARCH

Dry, unitized, pre-formulated antibody panels for rare event detection, immune function and immune system research

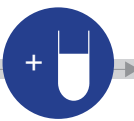
- Expert-proven assays
- Lean workflow, no antibody pipetting
- Minimized inventory management
- Allowing for flexibility where needed
- 25 tests/package including 3 compensation kits
- Ideally suited for use on the CytoFlex and the Navios Flow Cytometers



Add whole blood sample & incubate



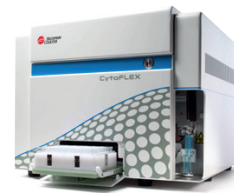
Lysis



Wash



Acquire



## DuraClone RE for Rare Event Detection

The dry DuraClone RE panels enable sensitive detection of rare abnormal cell populations in blood or bone marrow using carefully optimized and highly dosed antibody combinations.

Product - Part Number Target cells	405 nm		488 nm					633 nm		
	PB	Kr0	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-AF700	APC-AF750
<b>RE CLB Tube - B80393</b> Abnormal CD5+ mature B cells	CD20	CD45	CD81	ROR-1	-	CD79b	CD19	CD5	-	CD43
<b>RE PC Tube - B80394</b> Abnormal plasma cells	CD38	CD45	CD81	CD27	-	CD19	CD200	CD138	-	CD56
<b>RE ALB Tube - C00163</b> Abnormal immature B cells	-	CD45	CD58	-	CD34	CD10	CD19	-	CD38	CD20

For Research Use Only - Not for use in Diagnostic procedures

## DuraClone IF for Immune Functional Cytometry

The DuraClone IF panels reveal immune function at the single cell level utilizing a streamlined and simplified intracellular staining workflow.

Product Part Number	405 nm		488 nm					633 nm		
	PB	KrO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF700	AF750
IF T Activation <b>B88649</b>	CD4	-	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	-	-	IL-2	-	CD8	CD3
IF T Helper Cell <b>C04666</b>	IL-17A	-	IFN $\gamma$	-	-	-	IL-4	CD4	-	CD3
IF Monocytes Activation (2017, configuration not final)	CD14	CD45	-	HLA-DR	-	-	-	-	TNF $\alpha$	-

## DuraClone IM for Immune System Research

The dry DuraClone IM antibody panels provide a comprehensive image of the immune system applying dry expert-proven antibody combinations that are easy to implement.

Product Part Number	405 nm		488 nm					633 nm				
	PB	KrO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF647	AF700	APC-AF700	APC-AF750
IM Phenotyping Basic Tube <b>B53309</b>	-	CD45	CD16	CD56	CD19	-	CD14	CD4	-	CD8	-	CD3
IM B Cell Tube <b>B53318</b>	IgM	CD45	IgD	CD21	CD19	-	CD27	CD24	-	-	-	CD38
IM T Cell Subsets Tube <b>B53328</b>	CD57	CD45	CD45RA	CCR7	CD28	PD1	CD27	CD4	-	CD8	-	CD3
IM Dendritic Cells Tube <b>B53351</b>	HLA-DR	CD45	CD16	Lineage <sup>1</sup>	-	CD1c	CD11c	Clec9A	-	-	CD123	-
IM TCRs Tube <b>B53340</b>	TCRV $\delta$ 2	CD45	TCRV $\gamma$ $\delta$	TCR $\alpha\beta$	HLA-DR	-	TCRV $\delta$ 1	CD4	-	CD8	-	CD3
IM Treg Tube <b>B53346</b>	Helios	CD45	CD45RA	CD25	-	CD39	CD4	-	FoxP3	-	-	CD3
IM Granulocytes Tube <b>B88651</b>	CD15	CD45	CD294	-	CD16	CD33	CD11b	PD-L1	-	-	Lineage <sup>2</sup>	CD62L
IM Count Tube <b>C00162</b>	-	-	CD45	Counting Beads	-	7-AAD	-	-	-	-	-	-

PB: Pacific Blue\*  
KrO: Krome Orange  
AF647: Alexa Fluor\* 647

AF700: Alexa Fluor\* 700  
AF750: Alexa Fluor\* 750  
APC-AF700: APC-Alexa Fluor\* 700

APC-AF750: APC-Alexa Fluor\* 750  
Lineage<sup>1</sup>: CD3 / CD19 / CD20 / CD14 / CD56  
Lineage<sup>2</sup>: CD3 / CD14 / CD19 / CD56

For Research Use Only - Not for use in Diagnostic procedures

© 2017 Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

\* Alexa Fluor and Pacific Blue are registered trademarks of Molecular Probes, Inc.

FLOW-3028FLY09.17





**medias**  
international

*Z uami že od leta 1992*

**Medias International d.o.o.**  
Leskoškova cesta 9D  
SI-1000 Ljubljana  
Telefon: 01 52 02 300  
Fax: 01 52 02 495  
info@medias-int.si  
www.medias-int.si



**BD**

#### **BD MEDICAL**

- Diabetes - insulinke in igle za peresnike
- IV terapija
- Injekcijski sistemi
- Anestezija

#### **BD VACUTAINER**

- Sistemi za odvzem krvi
- Urinski sistemi

#### **BD MIKROBIOLOŠKI SISTEMI**

- Bactec sistemi za hemokulture
- Sensi diski
- Gojišča (Difco, BBL) in reagenti
- Identifikacijski sistemi Crystal, Phoenix ID/AST
- MGIT za TBC sistem

#### **BD BIOTEHNOLOGIJA**

- Pretočni citometri
- Monoklonska protitelesa
- Celične kulture
- Falcon laboratorijska plastika
- Molekularna diagnostika





# Sysmex CyFlow Solutions

Hardware, software and antibodies – a great match  
for your next discovery



CU3008



CU3006



**Z VAMI ŽE 20 LET**



**invitrogen**

**thermo**  
scientific

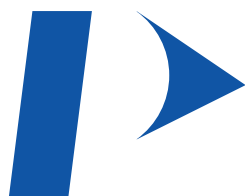
**gibco**

**ion**torrent

**applied**  
biosystems

---

**Authorised Distributor**



**PerkinElmer<sup>®</sup>**

*For the Better*



