

Προσδιορισμός $CD34^+$ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων



Ελληνική Εταιρεία
Κυτταρομετρίας



Βασιλική Ε. Καλοδήμου (PhD)

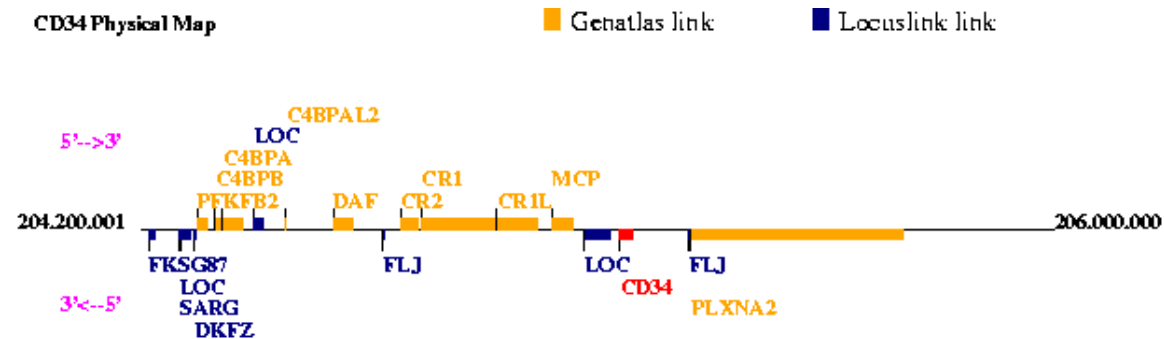
Μοριακή Γενετίστρια

Υπ. Τμήματος Κυτταρομετρίας Ποής- Έρευνας
& Αναγεννητικής Ιατρικής Μαιευτηρίου ΙΑΣΩ

Η χρονολογική σειρά των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (HPC) σε επιστημονικές εκθέσεις δείχνουν ότι οι πρώτες μελέτες επικαλούνται τα εμπύρηννα κύτταρα για την ποσοτικοποίηση.

Μεταγενέστερες μελέτες που περιλαμβάνουν μονάδα σχηματισμού αποικίας (CFU) έχουμε προσπάθεια κατά προσέγγιση των πληθυσμών προγονικών κυττάρων. Των χρόνο εντατικής ανιχνεύσεις με CFU ακολούθησε η ανακάλυψη του CD34⁺ κυττάρου, το οποίο βρέθηκε να είναι παρόν στην επιφάνεια των πρώιμων αιμοποιητικών κυττάρων και αιμοποιητικών αποικιών που σχηματίζουν τα κύτταρα στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα.

Το CD34 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας την οποία συναυτάμε σε ορισμένα κύτταρα μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Εκφράζεται όμως σε όλα σχεδόν τα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα.

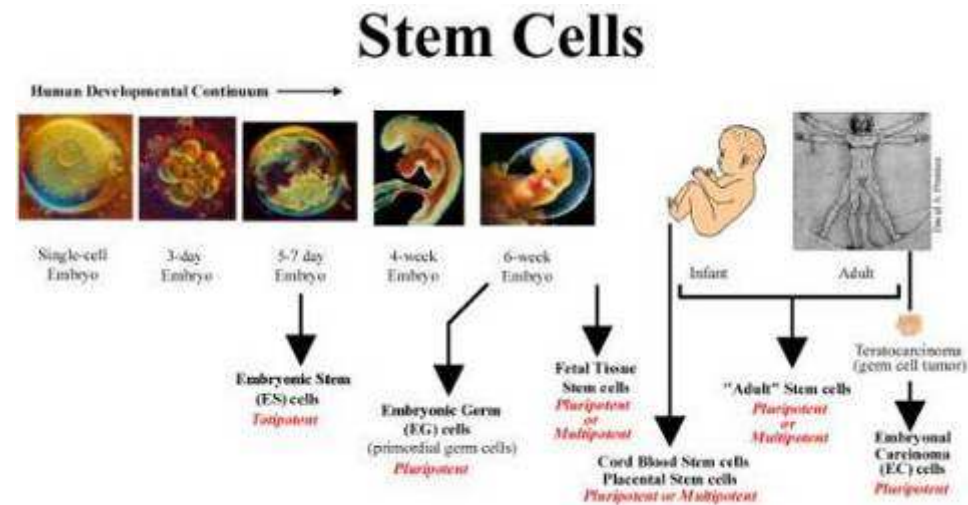


CD34 Physical map

Οι πηγές αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων :

- Μυελό των οστών
- Αίμα ομφάλιου λάρου
- Περιφερικό αίμα

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα είναι: $CD34^+ / CD45^{dim} / SSC^{low} / FSC^{low}$ to *intermediate*.

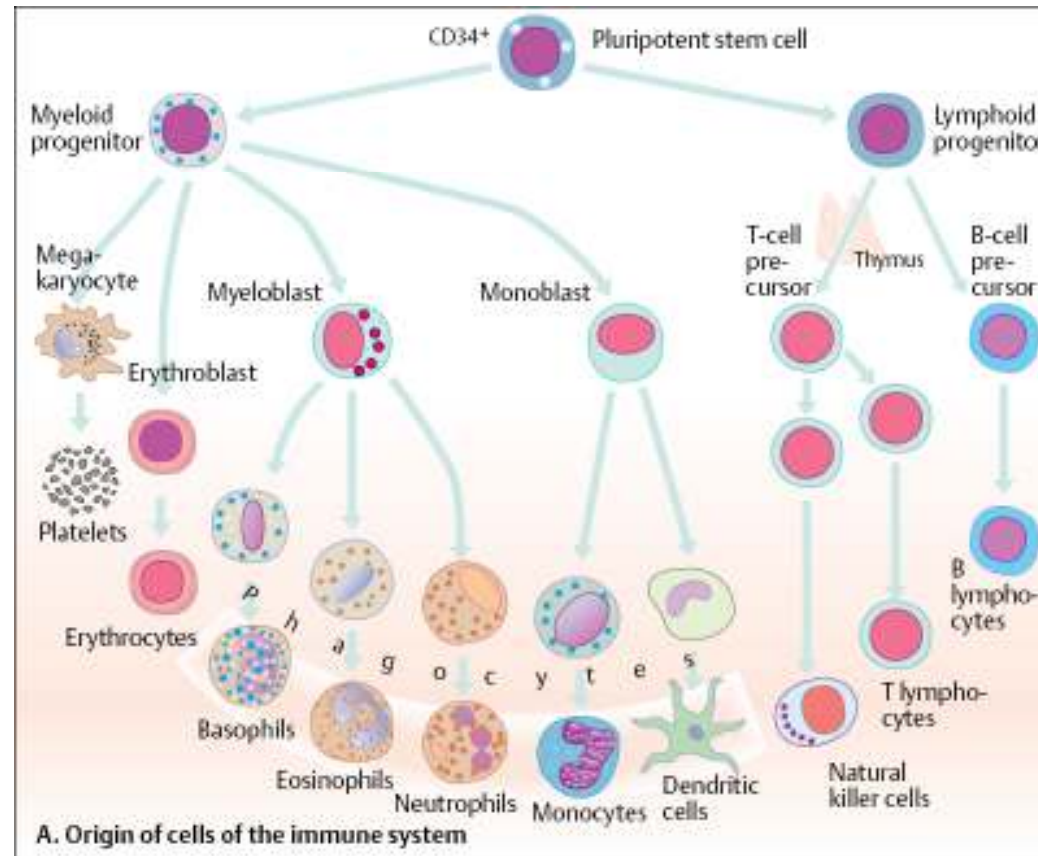


Πηγές βλαστικών κυττάρων και οι δυνατότητές τους

Η κατανομή τους στους ιστούς:

Κύτταρα που εκφράζουν το CD34 συνήθως τα συναντάμε στον ομφάλιο λώρο και το μυελό των οστών -τα αιμοποιητικά κύτταρα, σε ένα υποσύνολο των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, στα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, όχι όμως στα λεμφαγγεία, & σε ένα υπό-πληθυσμό δενδριτικών κυττάρων.

Τα ανθρώπινα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εκφράζουν το CD34 HSC's (Hematopoietic Stem Cells), το οποίο δε εκφράζεται στα ποντίκια.



Η λειτουργία :

Το CD34 εκφράζεται στους πρώιμους αιμοποιητικούς και αγγειακούς ιστούς. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για την ακριβή λειτουργία του.

Το CD34 είναι επίσης ένα σημαντικό μόριο προσκόλλησης και είναι απαραίτητο ώστε τα T κύτταρα να εισέλθουν στους λεμφαδένες.

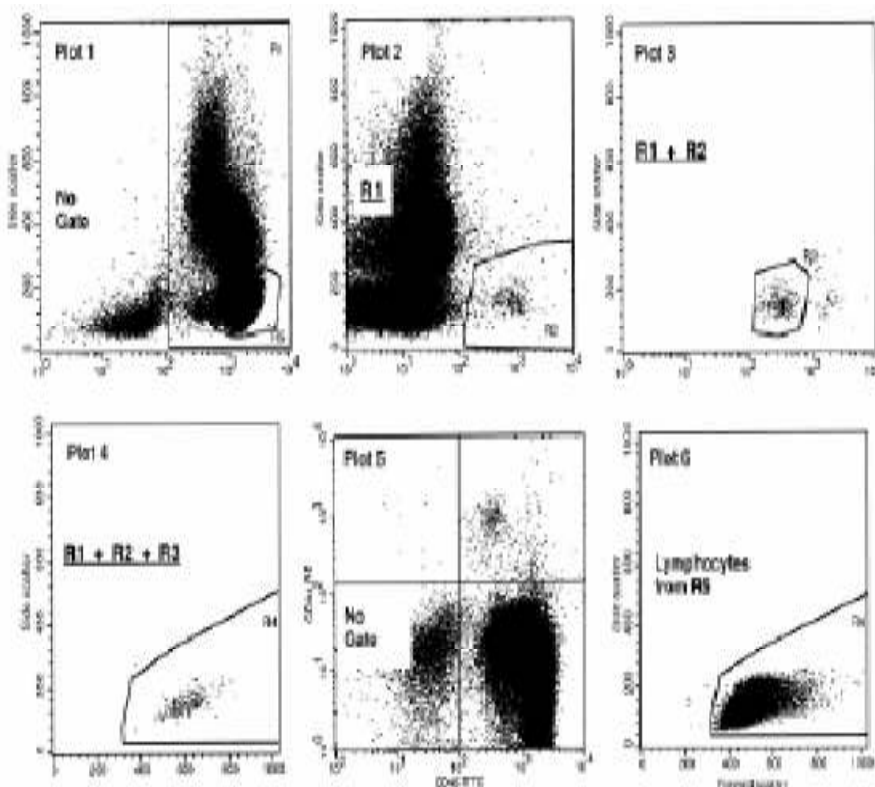
Ανεξάρτητα από τον τρόπο δράσης του, υπό όλες τις συνθήκες το CD34 έχειδειχθεί ότι διευκολύνει τη “μετανάστευση” των κυττάρων.

Η διεύρυνση της χρήσης βλαστικών κυττάρων σημαίνει ότι μια μέθοδος που με ακρίβεια και γρήγορα ποσοτικοποιεί τα CD34⁺ κύτταρα είναι πολύ αναγκαία.

Μια τέτοια μέθοδος είναι η κυτταρομετρία ροής.

Το πρωτόκολλο *ISHAGE* (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*) μετατράπηκε σε μέθοδο μίας τεχνικής (κυτταρομετρία) δίνοντας μας τη μέγιστη διαθέσιμη πληροφορία από τις εξής παραμέτρους:

- Χαρακτηριστικά σκέδασης και μεγέθους (*FSC, SSC*)
- Έκφραση *CD34* (αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα)
- Έκφραση έντασης *intensity CD45* (παυ-λευκοκυτταρικός δείκτης)
- Έκφραση 7- ακτινομυκίνης *D* (*7-AD*) (δείκτης βιωσιμότητας κυττάρων)



ISHAGE Gating Strategy – derived from ISHAGE Gating Protocol (Sutherland et al (1996))

Ο συνδυασμός των παραμέτρων με τη στρατηγική των διαδοχικών Boolean οριοθετήσεων μας δίνει δυνατότητα εφαρμογής σε:

- αίμα
- προϊόντα λευκαφαίρεσης
- καθαρά εναιωρήματα CD34+ κυττάρων
- αίμα ομφαλίου λώρου
- δείγματα μυελού των οστών
- ταυτόχρονη χρώση μονοκλωνικών CD34 και CD45:
 1. αποκλεισμό των θραυσμάτων (*debris*) και των δεδομένων με μη ειδική χρώση από την ανάλυση
 2. δημιουργία ενός αξιόπιστου παρονομαστή (*WBC*) απ' όπου είναι δυνατή η μέτρηση των CD34⁺ κυττάρων
 3. διάκριση των μη κακοήθων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, (έκφραση σχετικά χαμηλών επιπέδων CD45 στην επιφάνειά τους), από τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, (έκφραση σε υψηλά επίπεδα), και ταυτοποίησή τους βάση της έκφρασης CD45/SSC, (όπως των λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων).

Με ένα κυτταρόμετρο ροής σχεδιασμένο για να παρέχει απόλυτο αριθμό κυττάρων, μετράμε άμεσα τον πραγματικό αριθμό των κυττάρων CD34⁺ ($\times 10^6$ κύτταρα / μL) στο δείγμα και την βιωσιμότητά τους (%):

| <i>Results CD34⁺</i> | | <i>Viability %</i> | |
|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|-------|
| <i>Mean</i> | 2.83×10^6 | <i>Mean</i> | 0,78 |
| <i>Standard Error</i> | 0.03×10^6 | <i>Standard Error</i> | 0,001 |
| <i>Median</i> | 2.15×10^6 | <i>Median</i> | 0,78 |
| <i>Mode</i> | 1.90×10^6 | <i>Mode</i> | 0,8 |
| <i>Standard Deviation</i> | 2.2×10^6 | <i>Standard Deviation</i> | 0,07 |
| <i>Sample Variance</i> | 4.9×10^6 | <i>Sample Variance</i> | 0,006 |
| <i>Kurtosis</i> | 18.8×10^6 | <i>Kurtosis</i> | -0,17 |
| <i>Skewness</i> | 3.89×10^6 | <i>Skewness</i> | -0,07 |
| <i>Minimum</i> | 1.03×10^6 | <i>Minimum</i> | 0,61 |
| <i>Maximum</i> | 18.3×10^6 | <i>Maximum</i> | 0,98 |
| <i>Count</i> | 2.15×10^6 | <i>Count</i> | 4000 |
| <i>Confidence Level (95, 0%)</i> | 0.07×10^6 | <i>Confidence Level (95, 0%)</i> | 0,002 |

Table 2: CD34⁺ absolute count and viability (%): a statistical analysis after thawing of crypreserved stems cells showing the good quality of the samples as well as the cryopreservation and cytometric analysis procedures.

Γιατί να προσδιορίσουμε τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα;

1. Για να προσδιορίσουμε πότε πρέπει να εκτελέσουμε μεταμόσχευση μυελού των οστών με την χρήση των βλαστικών κυττάρων.
2. Για να προσδιορίσουμε αν θα συνεχιστεί η διαδικασία της αφαίρεσης.
3. Για να εκτιμήσουμε την βιωσιμότητας των κυττάρων του μυελού των οστών και του αίματος ομφαλίου λώρου.
4. Γιατί ο απόλυτος αριθμός των $CD34^+$ είναι καίρια παράμετρος για μια επιτυχή μεταμόσχευση.
5. Γιατί τα βλαστικά κύτταρα απαριθμούνται.



Οι Κλινικές Εφαρμογές :

Κύτταρα που χαρακτηρίζονται ως $CD34^+$ και $CD38^-$ έχουν αδιαφοροποίητη, πρωτόγονη μορφή. Δηλαδή είναι πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Έτσι, λόγω της έκφρασης του $CD34^+$, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα μπορούν να αναλυθούν.

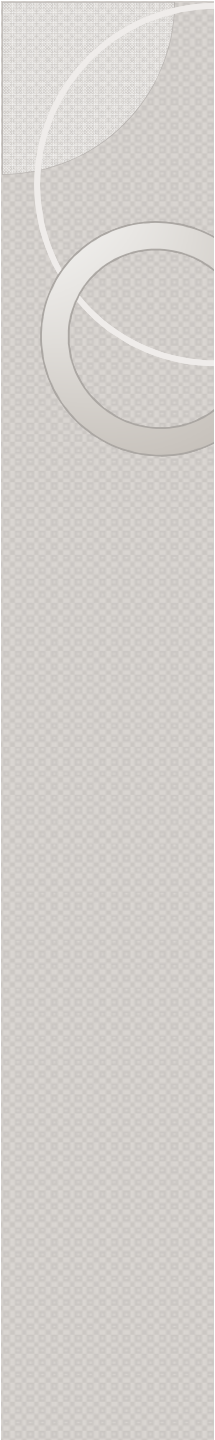
Τα $CD34^+$ κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από δείγματα αίματος χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοφθορισμού ή ανοσομαγνητισμού.

Χρησιμοποιούνται αντισώματα για την ποσοτικοποίηση και τον καθαρισμό των αιμοποιητικών προγονικών βλαστικών κυττάρων για την έρευνα και για την κλινική μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Ευχύσεις με $CD34^+$ αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα έχουν εφαρμοστεί στην κλινική πράξη για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένων την Κάκωση Νωτιαίου Μυελού, Κίρρωση του ήπατος και την περιφερική αγγειακή νόσο.

Η επιστημονική έρευνα έχει δείξει ότι τα $CD34^+$ κύτταρα είναι σχετικά περισσότερα στους άνδρες παρά στις γυναίκες που βρίσκονται στην αναπαραγωγική τους ηλικία. Η έρευνα έγινε σε ασθενείς με κακώσεις στον νωτιαίο μυελό.

(Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation, δημοσιεύονται στο τεύχος της 28^{ης} Απριλίου του Περιοδικού Journal of the American Medical Association).

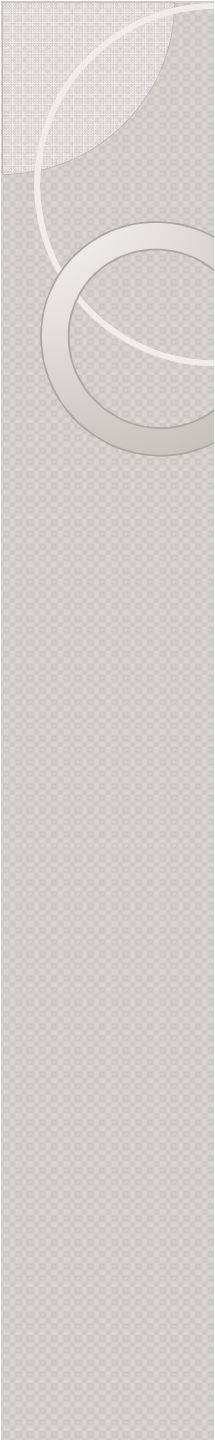


Οι μεταμοσχεύσεις περιφερικών προγονικών / αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος αποτελούν πλέον θεραπευτική επιλογή για αρκετές κακοήθειες.

Το αιμοποιητικό σύστημα του ασθενούς ή του δότη διεγείρεται προς παραγωγή πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων (stem cells), τα οποία εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα.

Το 2006 πραγματοποιήθηκαν παγκοσμίως 50.417 μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (οι ερευνητές εξείρεσαν ασθενείς που υφίσταντο μεταμόσχευση για δεύτερη ή τρίτη φορά).

Οι κυριότερες ενδείξεις ήταν λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές, αντιπροσωπεύοντας πάνω από τις μισές αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μεταμοσχεύσεις (54,4%), και λευχαιμίες (33,8%). Άλλες ενδείξεις ήταν συμπαγής όγκοι (5,8%), καλοήθεις διαταραχές (5,1%) και μη συγκεκριμένες ασθένειες (1%).



Ο μεγαλύτερος αριθμός των μεταμοσχεύσεων πραγματοποιήθηκε στην Ευρώπη (24.216 μεταμοσχεύσεις; 48% του συνόλου), όπου για τους σκοπούς της μελέτης συμπεριλαμβάνονται η Τουρκία και το Ισραήλ. Δεύτερη έρχεται η Αμερική (17.875 μεταμοσχεύσεις; 36%), μετά η Ασία (7.096; 14%) και τέλος η Ανατολική Μεσόγειος και η Αφρική (1.230; 2%).

Βλαστικά κύτταρα λαμβάνονται από το μυελό των οστών, από περιφερικό ή ομφαλοπλακουντιακό αίμα, και συλλέγονται από του ίδιους τους ασθενείς (αυτόλογη) στο 57% των περιπτώσεων και από γενετικά διαφορετικά άτομα (αλλογενής) στο 43% των περιπτώσεων.

Οι περισσότερες από τις αυτόλογες μεταμοσχεύσεις πραγματοποιήθηκαν σε Αμερική και Ευρώπη, ενώ οι αλλογενείς είναι πιο συνηθισμένες σε Ασία, Ανατολική Μεσόγειο και Αφρική.

Επίδραση κατά την φύλαξη του δείγματος:

Ο αριθμός των CD34+ κυττάρων επηρεάζεται από ποικιλία παραγόντων όπως:

- άμεση επεξεργασία του δείγματος

- απαραίτητη χρήση του 7-ΑΑΔ για τον αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων από την μέτρηση των CD34+ κυττάρων (συνδυασμός της με τις φθορίζουσες ουσίες FITC και PE) - κυρίως σε περιπτώσεις:

1. δειγμάτων μυελού των οστών
2. αίμα ομφαλίου λώρου
3. προϊόντων λευκαφαίρεσης άνω των 4 ωρών
4. δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία

- Για μια έγκυρη απάντηση απαιτείται μέτρηση 75,000 κυττάρων ή 100 αρχέγονων/προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells)

Εάν το λογισμικό δεν υπολογίζει τον απόλυτο αριθμό των CD34⁺ κυττάρων, τότε χρησιμοποιούμε την ακόλουθη σχέση:

$$\text{CD34}^+ \text{ κύτταρα}/\mu\text{L} = \frac{\text{αριθμός CD34}^+ \text{ κυττάρων (περιοχή D)} \times \text{B} \times \text{DF}}{\text{αριθμός beads (περιοχή G)}}$$

DF : ο παράγοντας αραιώσης του δείγματος και

B : η συγκέντρωση σφαιριδίων / * Τελικό αποτέλεσμα: ο μέσος όρος των δύο σωληνάρων

Απαιτείτε ιδιαίτερη προσοχή σε δείγματα με απόλυτο αριθμό CD34⁺ στην περιοχή D < 100, καθώς παρατηρείται μείωση στην επαυαληφισιμότητα της μεθόδου εξαιτίας του χαμηλού μετρούμενου αριθμού κυττάρων.

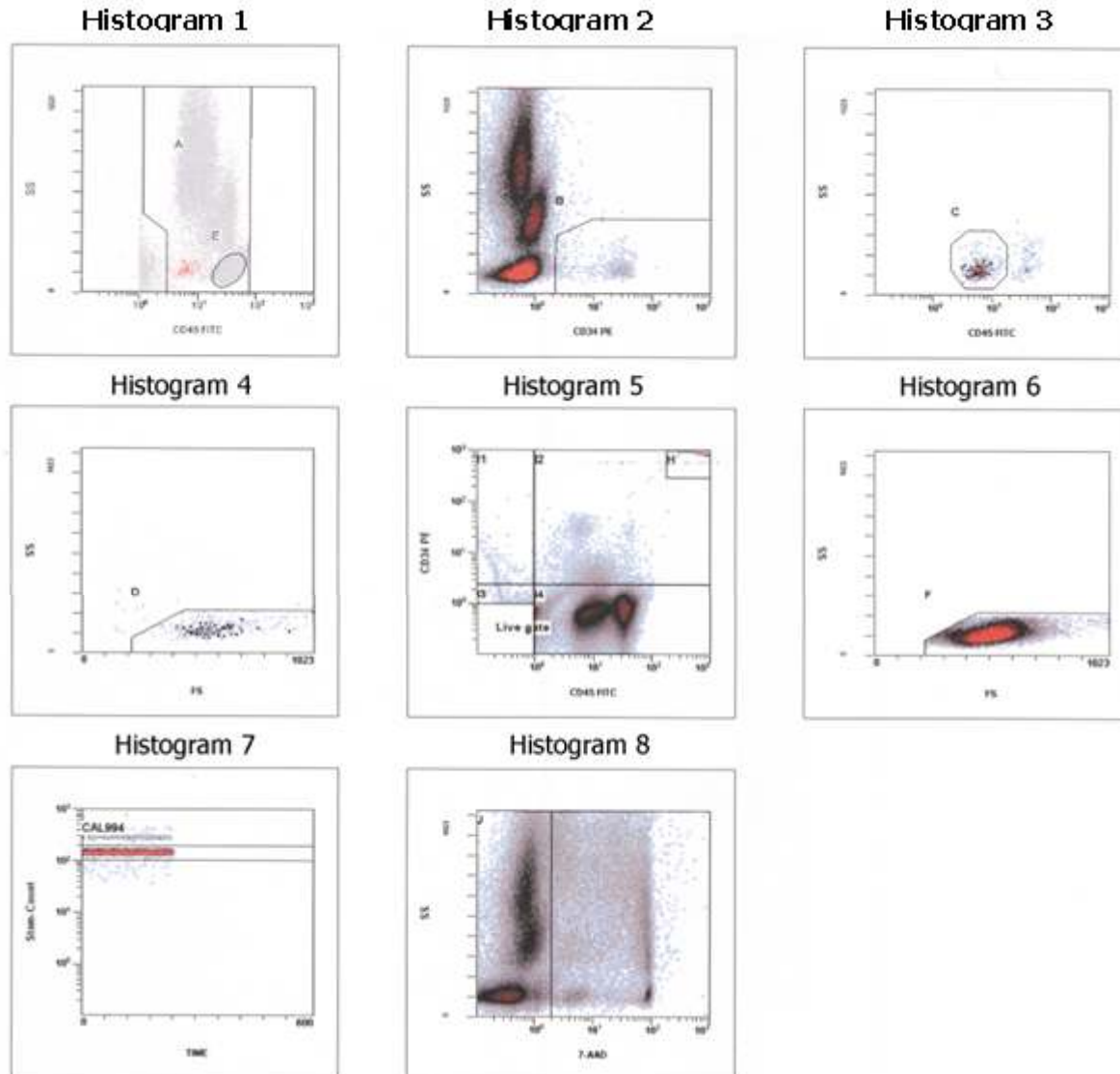


Figure 1: Gating strategy in cord blood samples. Data collected in a CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter) analyzer.

Histogram 1: displays viable events from region J (7-AAD negative). Positioned region A to include all CD45⁺ events (leukocytes) while excluding CD45⁻ events. Positioned region E to include only lymphocytes.

Histogram 2: displays events from region A and J. Adjusted region B to surround CD34⁺ HPC events.

Histogram 3: displays events from A and B and J. Adjusted region C to include cells forming a cluster with characteristic CD34⁺ HPC.

Histogram 4: displays events from A and B and C and J. Lymph/Blast region D identifies a cluster of events meeting all the fluorescence and light scatter criteria of ISHAGE Guidelines for CD34⁺ HPC.

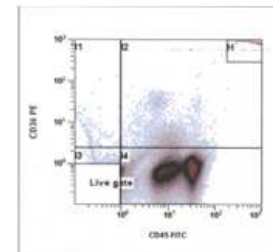
Histogram 5: displays all events. This histogram is useful to visualize the lower limit of CD45 expression within the CD34⁺ events.

Histogram 6: displays events from E and J regions.

Histogram 7: displays events from region H. Region J encloses the Stem-Count Fluorospheres singlet population.

Histogram 8: displays events from region A. Viable events are included within region J.

- Κατά την χρήση σωληνάρων απόλυτου αριθμού και όχι μικροσφαιριδίων, ο υπολογισμός του απόλυτου αριθμού των κυττάρων θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Όταν τα μετρούμενα σφαιρίδια είναι πολύ μικρά η δημιουργία *threshold* πρέπει να γίνεται σε μία παράμετρο φθορισμού και όχι στο FSC.
- Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση σωληνάρων απόλυτου αριθμού είναι η μείωση στην απαίτηση προσεκτικής εναιώρησης και κατά του πιπεταρίσματος των μετρούμενων σφαιριδίων. Απαραίτητο το σωστό πιπετάρισμα στις ακόλουθες περιπτώσεις:
 - ❖ προαραίωσης του δείγματος
 - ❖ μεταφοράς δείγματος στο σωληνάριο
 - ❖ κατά την προετοιμασία ορισμένων τύπων δειγμάτων (π.χ. λύση/no wash), όπως το αίμα του ομφαλίου λώρου, παρατηρείται κάποιες φορές ένα πολύ μεγάλο ποσοστό θραυσμάτων. Η λύση είναι η δημιουργία οριοθέτησης με αποκλεισμό των CD34⁺CD45⁺ στο 8^ο ιστόγραμμα πριν την απόκτηση των δεδομένων με αποτέλεσμα του αποκλεισμό ενός μεγάλου ποσοστού θραυσμάτων από το *list mode* αρχείο.



Histogram 8

Η Αναφορά Δεδομένων:

- Η Αναφορά των δεδομένων δίνεται ως απόλυτος αριθμός $CD34^+$ κυττάρων:
- Η αναφορά της βιωσιμότητας του δείγματος παίζει σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα. Θεωρείται απαραίτητη για την γενική εκτίμηση της ποιότητας ενός δείγματος, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις δειγμάτων αίματος ομφαλίου λώρου αλλά και σε δείγματα που έχουν αποθηκευτεί / κρυοσυντηρηθεί πάνω από 4 ώρες.
- Στα προϊόντα λευκαφαίρεσης που έχουν αποθηκευτεί κατά τη διάρκεια της νύκτας πρέπει να γίνεται πάντα επανέλεγχος, ώστε να εκτιμήσουμε την βιωσιμότητα τους πριν την κρυοκατάψυξη.
- Στην περίπτωση προϊόντων λευκαφαίρεσης και δειγμάτων αίματος ομφαλίου λώρου, ο υπολογισμός απόλυτου αριθμού $CD34^+$ κυττάρων γίνεται ανά κιλό βάρους του ασθενή και η εκτίμηση, (απόλυτου αριθμού), για την χρήση τους σε μεταμόσχευση γίνεται από τον θεράπων ιατρό.

Συμπερασματικά:

- ο απόλυτος αριθμός των $CD34^+$ κυττάρων στο δείγμα
- ο όγκος του ασκού των προϊόντων της λευκαφαίρεσης ή του δείγματος αίματος ομφαλίου λώρου
- το βάρος του ασθενούς

Τα Όρια Αναφοράς:

- Σε πολλά εργαστήρια εύρος $< 5-10 \text{ CD34}^+$ κύτταρα/ μL (threshold) είναι απαγορευτικό για την υποβολή του ασθενούς σε διαδικασία λευκαφαίρεσης.
- Η συγκέντρωση $\text{WBC} < 0.7 \times 10^9$ κύτταρα/ μL μας προειδοποιεί ότι ίσως να είναι ακατάλληλη η διαδικασία λευκαφαίρεσης, μιας και σε τόσο χαμηλά επίπεδα αίματος ο ακριβής καθορισμός της στοιβάδας των μονοπύρηνων θα αποτελέσει πρόβλημα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της λευκαφαίρεσης.
- Ο απόλυτος αριθμός των CD34^+ κυττάρων ανά κιλό βάρους του ασθενή είναι συνήθως $2-3 \times 10^6$ κύτταρα/ kg , για μία και μόνο διαδικασία μεταμόσχευσης.

Σας ευχαριστώ

