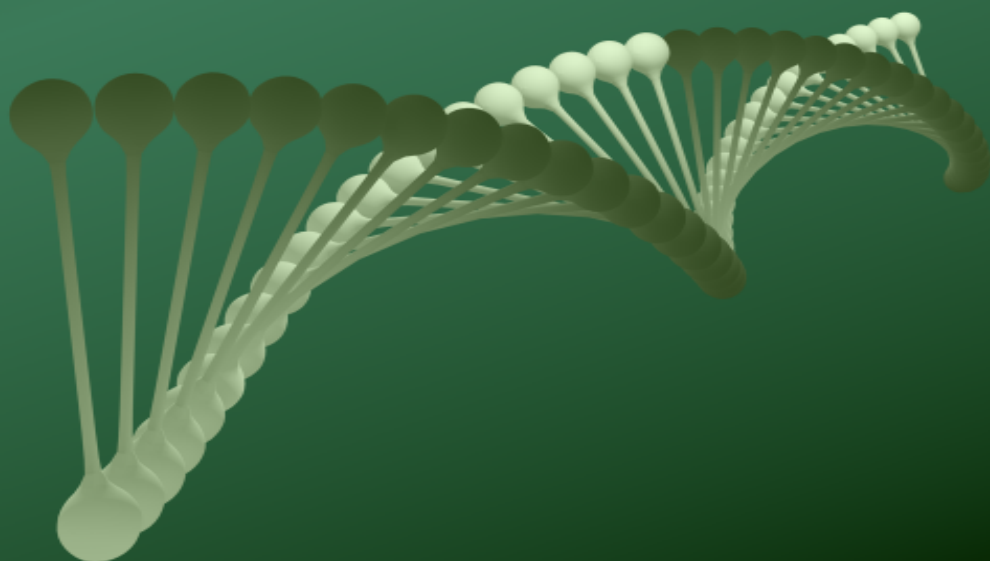


# **BADANIA IMMUNOGENETYCZNE W TRANSPLANTOLOGII I DIAGNOSTYCE**

**Praca zbiorowa pod redakcją  
Katarzyny Boguni-Kubik**



**BADANIA  
IMMUNOGENETYCZNE  
W TRANSPLANTOLOGII  
I DIAGNOSTYCE**

**Praca zbiorowa pod redakcją  
Katarzyny Boguni-Kubik**

Skład komputerowy, projekt okładki

*Tomasz Kubik*



Książka udostępniana na licencji Creative Commons: *Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Na tych samych warunkach 3.0*, Wrocław 2012. Pewne prawa zastrzeżone na rzecz Autorów i Wydawcy. Zezwala się na niekomercyjne wykorzystanie treści pod warunkiem wskazania Autorów i Wydawcy jako właścicieli praw do tekstu oraz zachowania niniejszej informacji licencyjnej tak długo, jak tylko na utwory zależne będzie udzielana taka sama licencja. Tekst licencji dostępny na stronie: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/pl/>

**ISBN 978-83-61512-40-0**

Wydawca

I-BIS S.C.

Druk i oprawa

I-BiS S.C., ul. Lelewela 4, 53-505 Wrocław

Skład niniejszej książki wykonano w systemie  $\text{\LaTeX}$

## SPIS TREŚCI

<b>Słowo wstępne</b>	<b>5</b>
<b>1. Wykorzystanie genotypowania HLA w procedurach doboru dawców krwiotwórczych komórek macierzystych</b> Jacek Nowak	<b>9</b>
<b>2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie</b> Anna Maria Gronkowska, Elżbieta Urbanowska	<b>21</b>
<b>3. Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej – znaczenie w doborze pary dawca biorca alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych</b> Milena Iwaszko, Katarzyna Gębura, Katarzyna Bogunia-Kubik	<b>40</b>
<b>4. Identyfikacja przeciwciał anti-HLA u chorych po przeszczepie hematopoetycznych komórek macierzystych</b> Urszula Siekiera	<b>53</b>
<b>5. Udział pracowni typowania tkankowego w procedurze alokacji nerek pobranych od dawców zmarłych</b> Michał Kolasiński	<b>58</b>
<b>6. Identyfikacja przeciwciał anti-HLA jako badanie zapobiegające odrzucaniu humoralnemu u biorców nerek podwyższonego ryzyka immunologicznego</b> Grażyna Moszkowska	<b>66</b>
<b>7. Częstość występowania HLA DRB1*03 i DRB1*04 u potencjalnych biorców nerek</b> Barbara Krasnodębska-Szponder, Katarzyna Galant, Izabela Czyżewska, Iwona Wojciechowska-Koszko, Stefania Giedryś-Kalemba	<b>77</b>
<b>8. Próba krzyżowa analizowana metodą cytometrii przepływowej</b> Barbara Piątoś	<b>84</b>
<b>9. Oznaczanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem immunofluorescencji</b> Piotr Wierzbicki, Danuta Kłosowska	<b>94</b>

<b>10. Liczba TREC jako marker diagnostyczny limfopoezy</b> Barbara Wysoczańska	100
<b>11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi</b> Monika Mordak, Marzena Lenart, Rafał Szatanek, Monika Baj-Krzyworzeka, Kazimierz Węglarczyk, Maciej Siedlar	111
<b>12. Częstość występowania HLA klasy I i II u pacjentów z ostrą białaczką szpikową, białaczkami limfatycznymi oraz u potencjalnych dawców szpiku</b> Barbara Krasnodębska-Szponder, Katarzyna Galant, Izabela Czyżewska, Barbara Zdziarska, Stefania Giedrys-Kalemba	126
<b>13. Badania technikami cytogenetyki klasycznej (kariotypowanie) i fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> (FISH) w hematologii</b> Barbara Pieńkowska-Grela	135
<b>14. Aberracje strukturalne DNA w nowotworowych rozrostach z komórki macierzystej hematopoezy</b> Marta Libura, Marta Przestrzelska, Marta Więsik, Karolina Karabin, Patrycja Rybarczyk, Albert Moskowicz	145
<b>15. STR i real-time PCR metody badania chimeryzmu poprzesczepowego</b> Anna Młynarczewska	155
<b>16. Współczesne technologie identyfikacji długości telomerów</b> Barbara Wysoczańska	160
<b>17. Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu</b> Lidia Karabon	170
<b>18. Diagnostyka laboratoryjna niepożądanych poprzetoczeniowych reakcji immunologicznych</b> Jolanta Korsak	182
<b>19. Znaczenie standaryzacji badań genetycznych: Międzylaboratoryjny Test Kontroli Jakości Badań FISH w Hematologii</b> Barbara Pieńkowska-Grela, Beata Grygalewicz	205
<b>20. Znaczenie standaryzacji badań immunogenetycznych: Warsztaty Kontroli Jakości Typowania HLA</b> Katarzyna Bogunia-Kubik	213

## SŁOWO WSTĘPNE

„Badania diagnostyczne w transplantologii i diagnostyce” to zbiór opracowań dotyczących rutynowej działalności laboratoriów diagnostycznych, współpracujących z ośrodkami medycznymi i transplantacyjnymi. Znalazły się w nim również doniesienia Autorów posługujących się na co dzień technikami biologii molekularnej w trakcie realizacji prac badawczych.

Pierwszym z poruszanych zagadnień jest problem optymalnego doboru dawcy i biorcy alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych. Dobór ten jest rutynowo prowadzony w oparciu o potwierdzenie genetycznej zgodności między dawcą i biorcą przeszczepienia w zakresie klasycznych *loci* HLA klasy I (A, B, C) i klasy II (DRB1 i DQB1). W czterech pierwszych rozdziałach monografii przedstawiono techniki molekularne wykorzystywane do genotypowania HLA, określono zasady doboru dawcy rodzinnego i poszukiwania dawcy nieskrewnionego oraz omówiono udział rejestrów honorowych dawców i banków krwi pępowinowej. Przedyskutowano również wyniki, które wskazują na potencjalne znaczenie typowania nieklasycznych *loci* HLA (np. HLA-E, HLA-G czy MICA/B) dla powodzenia alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych, oraz przedstawiono wstępne dane dotyczące monitorowania przeciwciał anty-HLA u biorcy przeszczepu.

Następnym poruszonym zagadnieniem jest dobór dawcy narządu unaczynionego. Opiera się on na wynikach typowania HLA *loci* A, B, DR oraz wynikach próby krzyżowej. W rozdziałach od piątego do siódmego omówiono rutynową procedurę doboru dawcy i biorcy oraz przedstawiono trudności w znalezieniu odpowiedniego dawcy dla pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka immunologicznego.

Poruszone zostały aspekty związane ze znaczeniem obecności przeciwciał anty-HLA u biorcy, z koniecznością określania ich swoistości oraz monitorowania obecności przeciwciał anty-HLA swoistych dla dawcy po transplantacji. W tej części przedstawiono również analizę porównawczą wyników typowania HLA w grupie potencjalnych biorców nerek i w populacji osób zdrowych.

Dwa następne rozdziały niniejszego zbioru dotyczą wykorzystania cytometrii przepływowej do wykonania próby krzyżowej oraz analizy wewnątrzkomórkowej produkcji cytokin.

Kolejne trzy rozdziały, od dziesiątego do dwunastego, poświęcono analizie związków liczby episomalnych cząsteczek DNA powstających podczas rearanżacji receptorów antygenowych limfocytów T (ang. *T cell receptor excision cycles*, TREC) oraz specyficzności prezentujących antygen cząsteczek HLA z chorymi. Pomiar liczby TREC stanowi pomocne narzędzie diagnostyczne w ocenie

zaburzonego procesu limfopoezy w wielu sytuacjach klinicznych, jak np. u pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności podczas terapii, pacjentów po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych oraz pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi. Z kolei typowanie HLA może być pomocne w prognozowaniu predyspozycji genetycznej do wystąpienia pewnych chorób, dynamiki postępu choroby, jak również w zdefiniowaniu klinicznych typów choroby. W pracy asocjacje HLA z chorobami przedstawiono na przykładzie związków z wybranymi chorobami o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnym i infekcyjnym oraz chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego.

Z rozdziałem dwunastym kończy się części monografii podkreślająca rolę typowania tkankowego oraz istotne znaczenie metod służących do typowania HLA w klinice człowieka. W pięciu kolejnych rozdziałach, od trzynastego do siedemnastego, przedstawiono techniki biologii molekularnej wykorzystane w badaniach zmian budowy materiału genetycznego - począwszy od liczby i struktury chromosomów oraz długości telomerów, a skończywszy na mutacjach wewnątrzgenowych i zmianach pojedynczych nukleotydach w sekwencji DNA. Techniki te znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce hematologicznej. Opisano badania aberracji związanych z przemieszczaniem dużych fragmentów DNA i mutacji wewnątrzgenowych, prowadzących do transformacji nowotworowych. Dzięki nim można również analizować zmienną długość telomerów i aktywność telomerazy w kontekście obserwowanych mutacji i wpływu na rozwój chorób rozrostowych. Wyniki tego typu badań pozwalają zrozumieć mechanizmy przedwczesnego starzenia komórkowego, osiągnięcia stanu spoczynkowego komórki, apoptozy oraz procesu nowotworzenia. Metody biologii molekularnej wykorzystywane są również do monitorowania przebiegu potransplantacyjnego i postępów leczenia, w tym do oceny właściwej odnowy hematologicznej i śledzenia choroby resztkowej (markery molekularne, poprzyszczepowy chimeryzm). Dostarczają też narzędzi badawczych, ukierunkowanych na diagnostykę potransplantacyjnych czynników prognostycznych.

Istotnym zagadnieniem poruszonym w opracowaniu jest diagnostyka laboratoryjna niepożądanych immunologicznych reakcji związanych z przetoczeniem krwi lub jej składników. Poświęcono mu rozdział osiemnasty.

Ostatnie dwa rozdziały niniejszego zbioru podkreślają znaczenie udziału pracowni diagnostycznych i immunogenetycznych w warsztatach kontroli jakości stosowanych technik laboratoryjnych.

Przedstawione prace podkreślają udział pracowni diagnostycznych, typowania tkankowego i laboratoriów immunogenetycznych w prawidłowym zdiagnozowaniu, przygotowaniu pacjenta do transplantacji, doborze odpowiedniego dawcy, monitorowaniu postępów leczenia i przebiegu potransplantacyjnego. Wspólny wysiłek pracowników tych instytucji, jak również placówek klinicznych i ośrodków przeszczepowych, przyczynia się do rozwoju transplantologii i diagnostyki oraz ma znaczący wpływ na wdrażanie innowacyjnych technologii w tych dziedzinach. Wprowadzanie zaś nowego panelu diagnostycznego we wskazanych sytuacjach klinicznych pozwala rozszerzyć badania o nowe czynniki rokownicze i lepiej zadbać o dobro pacjenta.

Niniejszy zbiór opracowań nie powstałby bez zaangażowania i życzliwości wszystkich Autorów. Dlatego chciałabym serdecznie za to podziękować, życząc wszystkim Autorom dalszych sukcesów i satysfakcji z wykonywanej pracy.

dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik, prof. nadzw.  
Wrocław, listopad 2012





# WYKORZYSTANIE GENOTYPOWANIA HLA W PROCEDURACH DOBORU DAWCÓW KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Jacek Nowak

*Zakład Immunogenetyki Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa*

## Streszczenie

Niezgodność aminokwasów w cząsteczkach HLA pomiędzy dawcą i biorcą przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) sprzyja występowaniu groźnych powikłań immunologicznych i infekcyjnych oraz pogarsza przeżycie biorców. W pracy przedstawiono zasady zastosowania odpowiednich metod badania HLA w procesie doboru dawcy KKM. Podczas wstępnych i potwierdzających badań chorych posiadających wskazania do transplantacji KKM i członków ich rodzin oraz wstępnych badań rekrutowanych niespokrewnionych dawców wymagane są przynajmniej badania HLA-A, B i DRB1 o niskiej rozdzielczości. Podczas selekcji niespokrewnionych dawców KKM zachodzi często konieczność wykonania badań dodatkowych *loci* lub badań A, B, DRB1 o wysokiej rozdzielczości, co jest czasochłonne. W procesie doboru preferowani są zatem niespokrewnieni dawcy o poziomie wytypowania wyższym od wymagań minimalnych. Ostateczne genotypowanie potwierdzające pary dawca-biorca musi być wykonane na odpowiednio wysokim poziomie rozdzielczości, pozwalającym na wykluczenie lub identyfikację niezgodności allelicznych w zakresie HLA-A, B, C, DRB1 i DQB1. Pomimo stosowania nowoczesnych technik biologii molekularnej otrzymanie niejednoznacznych wyników badań HLA jest często nie do uniknięcia. W pracy przedstawiono również przesłanki interpretacji oraz zasady walidacji niejednoznacznych wyników genotypowania HLA w aspekcie wyniku transplantacji. Racjonalne zastosowanie dostępnych metod genotypowania HLA o odpowiedniej rozdzielczości oraz prawidłowa interpretacja wyników są warunkiem doboru optymalnego dawcy KKM oraz zmniejszenia częstości występowania groźnych powikłań immunologicznych i infekcyjnych.

*Słowa kluczowe:* genotypowanie HLA, rozdzielczość metod badania HLA, niejednoznaczne wyniki badań HLA, immunogenetyczny dobór dawcy szpiku, alogeniczna transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych

## 1.1. Wstęp

Immunogenetyczna zgodność dawcy z biorcą przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) jest warunkowana sekwencją aminokwasów w cząsteczkach HLA mającą swe odzwierciedlenie w genotypach dawcy i biorcy, badanych na poziomie DNA. Niezgodność HLA lub sekwencji aminokwasów w obrębie peptydów prezentowanych w kontekście cząsteczek HLA sprzyja występowaniu groźnych powikłań immunologicznych i infekcyjnych po transplantacji KKM i pogarsza przeżycie biorców. Zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej do typowania HLA biorców i dawców wpłynęło na znaczną poprawę wyników alogenicznych transplantacji KKM [1]. Nadal jednak nie zawsze możliwe jest uzyskanie jednoznacznych wyników genotypowania w związku z wysokim stopniem złożoności układu HLA. Przyczynia się do tego zarówno niezwykle poligeniczność, jak i wysoki stopień polimorfizmu wielu genetycznych *loci* HLA [2]. Obserwowana jednocześnie wysoka homologia sekwencji wielu alleli [3] i współdominujące kodowanie genów HLA w układzie diploidalnym sprzyjają otrzymywaniu niejednoznacznych wyników genotypowania i utrudniają wiarygodne dobranie w pełni zgodnego dawcy KKM. W pracy przedstawiono zasady prawidłowego zastosowania odpowiednio dobranych metod badań HLA i interpretacji otrzymanych wyników w procesie doboru alogenicznego dawcy KKM.

## 1.2. Metody typowania HLA i prezentacji wyników

W doborze pary dawca-biorca KKM stosowane są różne metody typowania HLA oparte najczęściej na badaniu DNA [4]. Metoda hybrydyzacji ze swoistymi sondami oligonukleotydowymi (ang. *sequence-specific oligonucleotide probe-hybridization*, SSOP) polega na amplifikacji jednego lub kilku długich fragmentów genu HLA odpowiadających eksonom i sondowaniu ich poprzez odwrotną hybrydyzację z szeregiem krótkich sond genetycznych o znanych sekwencjach [5]. Sondy oligonukleotydowe opłaszczone są na mikrokulkach polistyrenowych (Luminex), mikromacierzach (Histo SPOT, BAG Health Care) lub paskach nitrocelulozowych (Innogenetics). Rozdzielczość metod zależy od liczby rozróżnialnych nośników (mikrokulek, spotów lub prążków) w teście oraz od różnorodności sond oligonukleotydowych immobilizowanych na rozróżnialnych nośnikach. Metodą SSOP bada się odrębnie każde *locus* i najczęściej można w ten sposób osiągnąć niską rozdzielczość badania HLA ograniczoną do „rodziny alleli”. Czynnione są wysiłki nad podwyższeniem rozdzielczości testów poprzez zwiększenie pojemności nośników sond, lub zastosowanie haplotypowo swoistych sond (tzw. *specialty probes*) mogących rozstrzygnąć niektóre niejednoznaczności *cis/trans*.

Metoda amplifikacji ze swoistymi primerami (ang. *sequence-specific primers*, SSP) obejmuje wykonanie wielu amplifikacji krótkich fragmentów genu HLA przy użyciu szeregu par primerów o znanych sekwencjach [6]. Amplifikacja przeprowadzana jest w wielu oddzielnych mieszaninach reakcyjnych, a wykrywanie produktów amplifikacji zachodzi w elektroforezie na żelu agarozowym. Zestaw primerów w testach SSP obejmuje kilkanaście lub więcej fragmentów jednego *lo-*

cus HLA, co pozwala na określenie alleli na poziomie niskiej rozdzielczości. Metoda SSP może być wzbogacona o drugi, dokładniejszy stopień. Wykorzystuje się wówczas kilkanaście lub kilkadziesiąt par primerów skierowanych do fragmentów jednej rodziny alleli, co może znacznie zawęzić wynik do jednego lub kilku alleli tej samej rodziny. Mówimy wówczas o wyniku na poziomie, odpowiednio, wysokiej lub pośredniej rozdzielczości. Rzadziej obecnie stosowaną metodą jest elektroforetyczna analiza konformacji po hybrydyzacji z referencyjną nicią DNA (ang. *reference strand-mediated conformation analysis*, RSCA) [7]. Pomiar opiera się na różnicy ruchliwości fragmentów DNA w elektroforezie kapilarnej na żelu poliakrylamidowym. Wadą tej metody jest zależność wyniku od szybkości migracji w elektroforezie, która może być podobna dla różniących się alleli, a dla nowych sekwencji nie jest znana. Zaletą jest separacja haplotypów i nie występowanie niejednoznaczności heterozygotycznych *cis/trans*. Sekwencjonowanie (ang. *sequencing-based typing*, SBT) jest metodą definitywną dla znacznie dłuższych fragmentów badanych genów niż wymienione wcześniej metody. Polega ono na wstępnej amplifikacji jednego lub kilku kompletnych eksonów z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie trifosforanów dideoksynukleotydów terminalnych dodanych do mieszaniny amplifikacyjnej w określonych proporcjach w stosunku do nie znakowanych trifosforanów „zwykłych” nukleotydów. Określenie sekwencji nukleotydów amplifikowanych fragmentów odbywa się na drodze rozwinięcia elektroforetycznego w kapilarach wypełnionych poliakrylamidem o liniowej cząsteczce (LPA) lub specjalnym polimerem rozdzielczym (ang. *performance optimized polymer 6*, POP6) i laserowej analizie fluorescencji kolejnych nukleotydów przy użyciu sekwenatora DNA. Powyższa wersja SBT opiera się na klasycznej metodzie sekwencjonowania wg. Sangera [8]. Nowsze wersje SBT, tzw. *new generation sequencing* (NGS) obejmują przygotowanie bibliotek DNA poprzez frakcjonowanie DNA próbki na małe fragmenty (najczęściej, poniżej 1000 bp) o tępych końcach, łączenie z sekwencjami adaptorowymi (biotynylowanymi primerami), immobilizację w obrębie mikroreaktorowych beadsów i klonalną amplifikację jednoniciowych fragmentów DNA [9]. Ostatnim etapem jest sekwencjonowanie przez syntezę, czyli pyrosekwencjonowanie [10]. Obydwie metody sekwencjonowania HLA wymagają zastosowania precyzyjnych procedur walidacji uzyskanych sekwencji oraz porównawczej analizy bibliotek znanych alleli HLA przy użyciu zaawansowanego oprogramowania. Dzięki zaawansowaniu technicznemu metody SBT pozwalają znacznie częściej niż SSOP czy SSP uzyskać wynik genotypowania HLA na poziomie podwyższonej lub wysokiej rozdzielczości.

### 1.3. Rozdzielczość metod genotypowania HLA

Genotypowanie HLA może dostarczyć informacji na poziomie niskiej, pośredniej, podwyższonej lub wysokiej rozdzielczości, w zależności od zastosowanych testów. Za badanie o niskiej rozdzielczości jest uznawane określenie grupy alleli o zbliżonej sekwencji, przedstawiane w zapisie w postaci nazwy *locus*, gwiazdki (świadczącej o genetycznym sposobie typowania) i ciągu dwóch cyfr określają-

## 1. Wykorzystanie genotypowania HLA w procedurach doboru ...

cych swoistość rodziny podobnych alleli (np. *A\*01* lub *DRB1\*15*). Badanie o wysokiej rozdzielczości dostarcza jednoznacznej informacji przynajmniej o tej części allelu HLA, która koduje sekwencję aminokwasów w cząsteczce HLA i odpowiada za efekt biologiczny (jednoznaczna identyfikacja antygeny HLA). Zapis wyniku genotypowania o wysokiej rozdzielczości obejmuje nazwę *locus*, gwiazdkę i przynajmniej dwa ciągi po 2 lub 3 cyfry, oddzielone dwukropkiem, oznaczające odpowiednio, rodzinę alleli i kolejny numer sekwencji eksonowej, np. *A\*02:115* lub *DRB1\*13:02*. Jednoznaczny zapis allelu może być dłuższy. Kolejny ciąg cyfr, występujący po drugim dwukropku w zapisie wyniku genotypowania HLA (np. *A\*24:02:01* i *A\*24:02:02*) dotyczy tzw. substytucji synonimowych (inny triplet nukleotydów koduje ten sam aminokwas), a kolejny czwarty ciąg cyfr po trzecim dwukropku dotyczy polimorfizmu nukleotydów w intronach, tj. poza obszarem kodowania białka (np. *A\*01:01:01:01* i *A\*01:01:01:02*). Niejednoznaczny wynik genotypowania HLA może obejmować kilka (czasami wiele) alleli należących do tej samej rodziny o niskiej rozdzielczości, np. *DRB1\*04:01/03/04/08* oznacza alternatywną obecność jednego z 4 alleli DRB1, tj. *DRB1\*04:01*, *DRB1\*04:03*, *DRB1\*04:04* lub *DRB1\*04:08*. Brak jednoznaczności wyniku na tym poziomie jest określany mianem wyniku o pośredniej rozdzielczości. Zapis wyniku o pośredniej rozdzielczości może ulec skróceniu dzięki zastosowaniu tzw. kodów NMDP, czyli dwu, trzy lub czteroliterowych skrótów, których ewidencję prowadzi National Marrow Donor Program na ogólnodostępnej stronie internetowej [11]. Przykładowo, zapis *DRB1\*04:01/03/04/08* można skrócić używając kodu *DRB1\*04:EX*. Określenie „wynik genotypowania HLA o podwyższonej rozdzielczości” oznacza istotne zawężenie wyniku o niskiej lub pośredniej rozdzielczości do niewielkiej grupy alleli, wśród których znajduje się tylko jeden allel CWD (pojęcie CWD wyjaśniono poniżej) lub allel typowy dla populacji, z której wywodzi się badana osoba. Jako przykład podwyższenia rozdzielczości można podać sytuację, w której w badaniu wstępnym wykryto *B\*27:02/05/16/28* (*B\*27:BBV*). Jest to wynik o pośredniej rozdzielczości, gdyż obejmuje dwa allele – *B\*27:02* i *B\*27:05*, należące do CWD i częste również w populacji polskiej. Po wykonaniu ściślejszego badania otrzymano wynik *B\*27:02/16/28* (*B\*27:AXW*) o podwyższonej rozdzielczości, gdyż allele *B\*27:16* i *B\*27:28* nie należą do CWD i nie występują w polskiej populacji. Jedynym prawdopodobnym allelem pozostał w tej sytuacji *B\*27:02*, co zbliża taki wynik pod względem informatywności do wyniku o wysokiej rozdzielczości.

Niejednoznaczne wyniki stanowią istotny problem diagnostyczny w związku m.in. z nieokreślonym znaczeniem praktycznym dodatkowych alleli niewykluczonych w badaniu o pośredniej rozdzielczości. Próbuąc rozwiązać niedogodności związane z wykonywaniem wielu dodatkowych typowań wymaganych niekiedy przez transplantologów pragnących oprzeć się na jednoznacznych wynikach, przeprowadzono szerokie badania allelicznego poziomu HLA metodami definitywnymi i określono zakres niejednoznaczności, które zawsze były rozstrzygane w postaci genotypu zawierającego najczęstsze allele. W badaniu Cano i wsp. [12] przeprowadzonym na reprezentatywnej dla populacji ogólnoswiatowej grupie ponad 25 000 osób zdefiniowano tzw. powszechne i dobrze udokumentowane allele HLA (ang. *common and well-documented*, CWD). Lista alleli

należących do CWD obejmuje w zależności od *locus* od 26% do 33% wszystkich odkrytych dotąd alleli HLA. Sposób interpretacji niejednoznacznych wyników badań HLA zaakceptowany przez Amerykańskie Towarzystwo Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki (ang. *American Society of Histocompatibility and Immunogenetics*, ASHI) pozwala na zdefiniowanie genotypów HLA (genotyp obejmuje dwa odrębnie kodowane allele w *locus*) na poziomie wysokiej rozdzielczości. Zgodnie z definicją ASHI genotyp o wysokiej rozdzielczości może zawierać szereg alternatywnych genotypów pod warunkiem, że tylko jeden z nich zawiera jeden (u homozygot) lub dwa (u heterozygot) allele CWD, a wszystkie pozostałe alternatywne genotypy zawierają allele rzadkie, nie należące do CWD [12]. Oceniono, że genotyp obejmujący dwa allele CWD jest ok. 10 000 razy bardziej prawdopodobny niż każdy z alternatywnych genotypów zawierających dwa rzadkie allele. Jeśli alternatywne genotypy zawierają różne allele CWD to wynik nie jest uznawany za badanie o wysokiej rozdzielczości, a niejednoznaczności te muszą być w razie potrzeby rozstrzygnięte w bezpośrednim genotypowaniu.

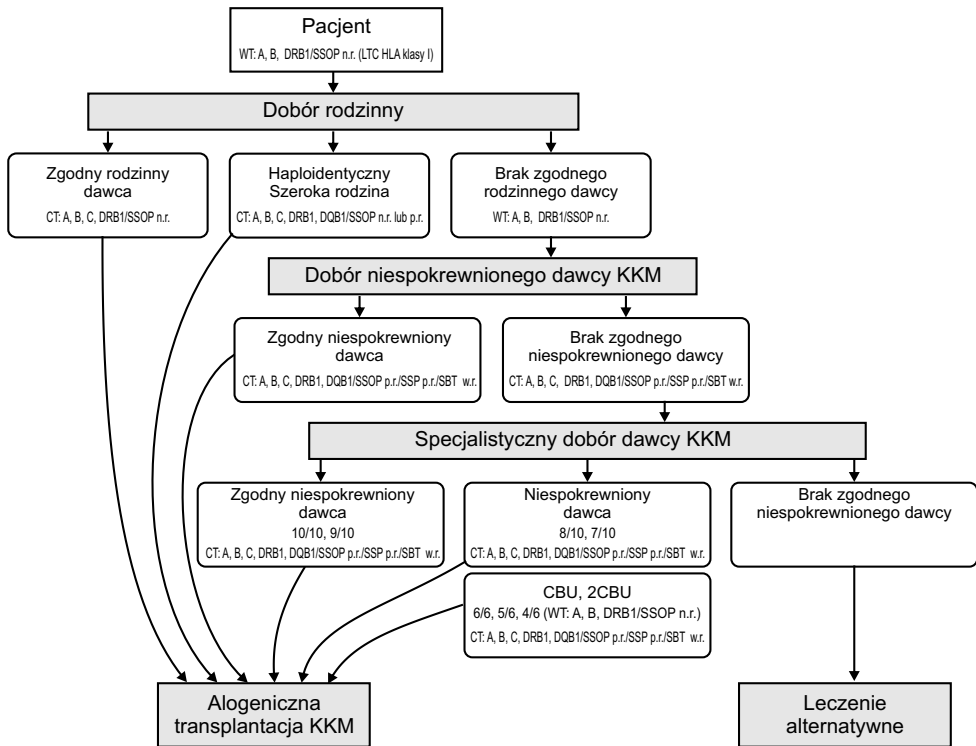
Dodatkowo, zgodnie z definicją ASHI, a także Europejskiej Federacji Immunogenetyki (EFI) wynik o wysokiej rozdzielczości może zawierać kilka alternatywnych alleli pod warunkiem, że substytucje nukleotydów występujące wewnątrz eksonów zlokalizowane są poza istotnym z punktu widzenia efektu biologicznego obszarem rozpoznania antygenowego (ang. *antigen recognition site*, ARS), tj. poza eksonami 2 i 3 alleli klasy I i eksonem 2 alleli klasy II. Wydaje się, że łączne kryterium „obu alleli należących do CWD plus możliwość substytucji poza obszarem ARS” stanowi racjonalną podstawę decyzji klinicznych odnośnie zgodności tkankowej pomiędzy dawcą i biorcą KKM. Istotną korzyścią wynikającą z przyjęcia powyższej definicji wyniku genotypowania o wysokiej rozdzielczości może być przyspieszenie doboru pary dawca-biorca, co ma istotne znaczenie kliniczne [13] w związku z zapotrzebowaniem na szybkie doборы dawców HSC dla zwiększającego się odsetka biorców, u których wykryto ostrą białaczkę [14]. Ostateczny wynik typowania HLA powinien obejmować jedną parę alleli CWD oraz zawierać informację, że kompletna lista wszystkich alternatywnych genotypów, których nie wykluczono w bezpośrednim genotypowaniu znajduje się w laboratorium i zostanie udostępniona na prośbę lekarza.

Obecnie wszystkie cztery poziomy rozdzielczości wyników badań HLA jak również interpretacja CWD/ARS znajdują zastosowanie w praktyce na różnych etapach rekrutacji i doboru dawców KKM do transplantacji.

## **1.4. Różne fazy doboru dawcy KKM wymagają odpowiedniego zakresu i rozdzielczości genotypowania HLA**

Dobór dawcy alogenicznego przeszczepu KKM jest procesem wieloetapowym (Rycina 1.1). Procedura doboru rozpoczyna się od ustalenia wskazań do alotransplantacji KKM, połączonego z wstępnym badaniem HLA pacjenta i członków jego najbliższej rodziny, tj. rodzeństwa i rodziców. Minimalny zakres wstępnego

## 1. Wykorzystanie genotypowania HLA w procedurach doboru ...



Rycina 1.1: Algorytm doboru dawcy alogenicznego przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych z uwzględnieniem wykorzystania metod genotypowania HLA. WT, wstępne typowanie; CT, typowanie potwierdzające; SBT, metoda oparta na sekwencjonowaniu genów; SSOP, metoda swoistych sond oligonukleotydowych; SSP, metoda swoistych primerów; LCT, serologiczna metoda typowania HLA klasy I, tj. test limfocytotoksyczny; KKM, przeszczep zawierający krwiotwórcze komórki macierzyste; CBU, jednostka krwi pępowinowej (ang. *cord blood unit*); n.r., niska rozdzielczość; p.r., pośrednia/podwyższona rozdzielczość; w.r., wysoka rozdzielczość.

badania rodzinnego obejmuje *loci* HLA-A, B i DRB1 o niskiej rozdzielczości i najczęściej bywa wykonywany przy użyciu generycznych testów HLA wykorzystujących metodę PCR-SSP lub PCR-SSOP o niskiej lub pośredniej rozdzielczości.

Na tym etapie, służącym do wykazania istnienia lub braku zgodnego dawcy rodzinnego, oprócz wyników genetycznego typowania HLA-A, B i DRB1 możliwe jest alternatywne wykorzystanie wyników serologicznych badań HLA klasy I. Ze względu na ograniczoną wiarygodność badań serologicznych [15] wymaga to jednak zastosowania jednoznacznych elementów kontroli. Przede wszystkim, oprócz chorego i rodzeństwa badanie powinno obejmować również rodziców. Ponadto, rodzina powinna być odpowiednio liczna, aby możliwe było określenie segregacji haplotypów. Wyniki serologicznych badań HLA klasy I, zwłaszcza interpretowane bez należytej ostrożności, obejmujące jedynie chorego i jego rodzeństwo mogą w niektórych przypadkach spowodować omyłkową dys-

kwalifikację zgodnego dawcy albo kwalifikację dawcy niezgodnego. Dodatkowym zabezpieczeniem przed skutkami podobnych błędów oraz możliwych pomyłek administracyjnych powinno być wykonanie genotypowania potwierdzającego (ang. *confirmatory typing*, CT) wyselekcjonowanej, potencjalnie zgodnej pary rodzinny dawca – biorca, obejmującego nowe próbki krwi obu osób. Minimalnym zakresem rodzinnego genotypowania potwierdzającego w przypadku całkowitej zgodności są *loci* HLA-A, B, C i DRB1 na poziomie niskiej rozdzielczości. Mówimy wówczas o zgodności 8 alleli spośród 8 badanych, czyli o zgodności 8/8. W niektórych krajach zalecane jest również badanie *locus* DQB1 w celu potwierdzenia zgodności haplotypów HLA. Wymagania odnośnie zakresu badań HLA pary dawca - biorca są rozszerzone w przypadku kwalifikacji częściowo niezgodnego dawcy rodzinnego w związku z różnicami haplotypowymi na poziomie alleli. Częściowo niezgodny dawca rodzinny jest zwykle identyczny z chorym w zakresie jednego haplotypu HLA oraz zgodny na zasadzie przypadku w zakresie niektórych *loci* drugiego haplotypu. Aby potwierdzić spodziewany stopień zgodności należy dokonać precyzyjnej analizy haplotypów w rodzinie i w razie wątpliwości wykonać badanie o wysokiej rozdzielczości w zakresie wybranych *loci* HLA, tj. A, B, C, DRB1 i/lub DQB1. Rozszerzone badanie potwierdzające wykonywane w przypadku niepełnej zgodności dawcy rodzinnego ma na celu uzyskanie kompletnej informacji o liczbie i swoistości alleli niezgodnych w badanym zakresie. Brak zgodnego dawcy rodzinnego i wykrycie nieakceptowalnych niezgodności u haplotypowo identycznego dawcy rodzinnego stanowi wskazanie do poszukiwania niespokrewnionego dawcy przeszczepu KKM, o ile istnieje medyczne wskazanie do transplantacji od dawcy alternatywnego [16].

Immunogenetyczny dobór niespokrewnionego (lub alternatywnego) dawcy ma na celu znalezienie w rejestrach wolontariusza o odpowiednim stanie zdrowia i pełnej zgodności immunogenetycznej w zakresie pięciu najważniejszych *loci* HLA, tj. A, B, C, DRB1 i DQB1 na poziomie alleli [17]. Wstępne dane zawarte w rejestrach są najczęściej ograniczone do trzech (A, B i DRB1) lub nawet dwóch (A i B) *loci* HLA i do poziomu niskiej rozdzielczości. Dane te w większości przypadków nie są wystarczające do wskazania dawcy, który w wyniku badań potwierdzających okazałby się zgodny na poziomie alleli wszystkich 5 wymaganych *loci*. Konieczność wykonania badań dodatkowych *loci* (C lub DQB1 o niskiej rozdzielczości), lub badań *loci* DRB1, B lub A o podwyższonej rozdzielczości nie zachodzi w przypadku dawców, którzy podczas rekrutacji mieli wykonane rozszerzone badania HLA. Dawcy tacy są preferowani przez ośrodki wykonujące dobór, zwłaszcza w przypadku chorych zagrożonych szybką progresją lub krótką remisją choroby, lub gdy dobór jest pilny z innych przyczyn medycznych. Z punktu widzenia chorego bardzo korzystne jest rozszerzenie wstępnego typowania dawców do rejestru o *locus* C na poziomie niskiej rozdzielczości oraz najbardziej polimorficznego *locus* jakim jest HLA-B do podwyższonej/wysokiej rozdzielczości. Z tych samych powodów pełna informacja na temat wszystkich niejednoznacznych alleli uzyskanych w badaniu o pośredniej rozdzielczości, np. zapisana w postaci kodów NMDP może się okazać wystarczająco informatywna, aby rozstrzygnąć czy dawca jest potencjalnie zgodny z chorym w zakresie wątpliwego *locus*.



## 1. Wykorzystanie genotypowania HLA w procedurach doboru ...

Dlatego absolutnie konieczne jest rutynowe przekazywanie przez ośrodki dawców szpiku uzupełnionych genotypów rekrutowanych do rejestru dawców, zawierających kody NMDP, jeśli informacja o możliwych alternatywnych allelach wynika z przeprowadzonych wstępnych badań HLA. Może się to przyczynić do skrócenia czasu trwania doboru zgodnego dawcy KKM. W przypadku zgodności 10/10 wyniki genotypowania potwierdzającego na poziomie wysokiej rozdzielczości dawcy i chorego raportowane są do ośrodka transplantacji szpiku z propozycją akceptacji dawcy.

Dobranie całkowicie zgodnego niespokrewnionego dawcy często wymaga wykonania precyzyjnie zaplanowanych typowań uzupełniających u jednego, kilku, a czasem u wielu wyselekcjonowanych potencjalnych dawców i mogą obejmować jedno lub kilka *loci* HLA, co jest czasochłonne i kosztowne. Badania rozszerzające mają na celu wyjaśnienie polimorfizmu dawców lub poszukiwanie u dawców charakterystycznych dla chorego rzadkich sprzężeń haplotypowych pomiędzy *loci* B-C, DRB1-DQB1 i innymi. Zjawisko silnej nierównowagi sprzężeń pomiędzy wszystkimi *loci* HLA sprawia, że etap rozszerzającego typowania wybranych *loci* HLA może być kluczowy dla znalezienia w pełni zgodnego dawcy. Mogą tutaj być stosowane metody o niskiej, pośredniej lub wysokiej rozdzielczości, zależnie od rodzaju polimorfizmu obserwowanego u potencjalnych dawców. Badania rozszerzające powinny być tak zaplanowane, aby wyłonić przynajmniej jednego dawcę, który w genotypowaniu potwierdzającym okaże się zgodny z chorym w zakresie 10/10 [18].

Innym wynikiem pierwszej fazy doboru niespokrewnionego dawcy może być wykazanie braku pełnej zgodności wyselekcjonowanego dawcy. Przeprowadzana jest wówczas powtórna analiza dostępnych danych HLA potencjalnych dawców obejmująca globalną bazę BMDW i szczegółowe raporty rejestrów krajowych celem określenia szansy dobrania dawcy 10/10. W przypadku braku potencjału, określana jest szansa dobrania akceptowalnego częściowo niezgodnego niespokrewnionego [17] lub rodzinnego dawcy albo jednostek krwi pępowinowej, zgodnych w zakresie 6, 5 lub 4 spośród 6 swoistości HLA-A, B i DRB1. Próba dobrania każdego kolejnego akceptowalnego dawcy jest coraz mniej skuteczna i coraz bardziej czasochłonna. Czas upływający pomiędzy rozpoznaniem choroby, a wykonaniem transplantacji powinien być możliwie krótki w związku ze znacznie pogarszającymi się wynikami w przypadku wykonania transplantacji w nie optymalnej lub zaawansowanej fazie choroby [19]. Przedłużający się czas trwania doboru po niepowodzeniu pierwszej jego fazy wynika z konieczności badania najczęściej wielu dawców, u których nie znane, a po zbadaniu najczęściej niezgodne z chorym są niektóre swoistości HLA o wysokiej rozdzielczości. Może to oznaczać, że pacjent posiada unikalne sprzężenia swoistości genetycznych niektórych *loci* lub unikalny genotyp HLA na poziomie alleli. Racjonalnym postępowaniem jest wówczas zbadanie w zakresie wątpliwych *loci* reprezentatywnej próby, np. 10-25 spośród 100 lub więcej potencjalnych, słabo wytypowanych dawców raportowanych w BMDW oraz wzmocnienie informatywności badania poprzez określenie proporcji dawców niezgodnych do niezbadanych w zakresie alleli wątpliwego *locus*. Badanie reprezentatywnej próby potencjalnych dawców w trybie

typowania uzupełniającego powinno być wykonane możliwie sprawnie, tj. w całej grupie jednocześnie, a w przypadku pacjentów pilnych sprowadzenie próbki i wykonanie ostatecznego typowania potwierdzającego o wysokiej rozdzielczości powinno dotyczyć dwóch lub więcej wyselekcjonowanych dawców jednocześnie [20]. Liczne przykłady potwierdzają możliwość selekcji dawcy 10/10 lub 9/10 w reprezentatywnej grupie oraz brak skuteczności uporczywego badania dodatkowych dawców powyżej reprezentatywnej próby w przypadkach unikalnego genotypu HLA chorego [21].

W przypadkach braku potencjalnych dawców wytypowanych w zakresie HLA-A, B i DRB1 istnieje bardzo mała szansa na zgodność dawcy wytypowanego tylko w zakresie genów klasy I, tj. A i B. Obecnie rejestry raportujące do BMDW obejmują ok. 3 mln. tak zwanych dawców A,B. Szansa na pełną zgodność 10/10 któregoś z dawców A,B wzrasta około ośmiokrotnie ( $p=0.006$ ), gdy zgodne są również antygeny HLA-C [22]. Jest to dodatkowym uzasadnieniem dla wykonywania genotypowania HLA-C przynajmniej o niskiej rozdzielczości, już na wstępnym etapie rekrutacji dawców.

W przypadku wykazania unikalnego genotypu HLA chorego i wyczerpania możliwości doboru dawcy o stopniu zgodności 10/10 i 9/10 możliwe bywa wykorzystanie wielkiego populacyjnego potencjału BMDW i próba przeprowadzenia haplotypowego doboru dawcy o stopniu zgodności 9/10 [23]. Podstawą haplotypowego doboru jest obserwacja, że pojedyncza niezgodność swoistości jednego z dystalnych *loci* haplotypu HLA (tj. A lub DQB1) jest w populacji europejskiej mniej szkodliwa niż niezgodność swoistości centralnych *loci* haplotypu HLA [19]. Sposób haplotypowego doboru dawcy na przykładzie chorej z ostrą białaczką limfoblastyczną przedstawiono wcześniej [24].

Dobór haplotypowy jest ułatwiony po zastosowaniu populacyjnej analizy haplotypowej pod kątem haplotypów chorego, przy użyciu oprogramowania PHASE KEY v. 1.0, opracowanego w Zakładzie Immunogenetyki Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (oprogramowanie wraz z instrukcją obsługi dostępne u autora). Ostatecznym wynikiem uzupełniających badań HLA wraz z analizą haplotypową jest często wykazanie niezgodności jednego antygeny w *locus* A lub DQB1 i potwierdzenie zgodności wszystkich pozostałych alleli. Wynik taki wskazuje na zgodność jednego haplotypu w całości, jak również całej pozostałej części haplotypu niezgodnego w *locus* A lub DQB1. Oznacza to możliwość dobrania dawcy o stopniu zgodności 9/10 pochodzącego z puli dawców częściowo niezgodnych, nie zaś spośród dawców potencjalnie w pełni zgodnych.

Innym sposobem pokonywania trudności związanych z brakiem zarówno optymalnego rodzinnego, jak i niespokrewnionego dawcy komórek krwiotwórczych jest transplantacja jednej lub dwóch jednostek krwi pępowinowej (Rycina 1.1). Transplantacja krwi pępowinowej łączy się przeważnie z niezgodnością jednej lub dwóch spośród 6 części HLA-A, B, DRB1 (zgodność 5/6 lub 4/6), lecz niezgodności te są stosunkowo dobrze tolerowane z powodu niedojrzałości i większej plastyczności immunologicznej w porównaniu z komórkami pochodzącymi od dorosłego dawcy. Rekomendowanym poziomem zgodności w przypadkach przeszczepień krwi pępowinowej jest zgodność 6/6, 5/6 lub 4/6 swoisto-

ści zbadanych w zakresie HLA-A i B na poziomie antygenowym (niska rozdzielczość) oraz DRB1 na poziomie allelicznym (wysoka rozdzielczość). Jednocześnie zaleca się uzupełnienie badań w zakresie A, B, C, DRB1 i DQB1 na poziomie alleli w celu umożliwienia racjonalnej oceny zagrożenia wystąpieniem ostrej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD) i odrzuceniem przeszczepu [25].

## 1.5. Podsumowanie

Genotypowanie HLA przy użyciu prawidłowo dobranych i skrupulatnie kontrolowanych metod molekularnych jest podstawowym elementem doboru pary dawca-biorca alogenicznego przeszczepu KKM. Współczesna immunogenetyka dysponuje szerokim arsenałem molekularnych metod służących do identyfikowania sekwencji genów HLA. Metody te charakteryzują się różnorodnością zastosowanych technologii i różnym zakresem definiowanych sekwencji DNA. Odmienne są również potrzeby badawcze podczas genotypowania HLA. Podczas wstępnych i potwierdzających badań chorych posiadających wskazania do transplantacji KKM i członków ich rodzin oraz wstępnych badań rekrutowanych niespokrewnionych dawców najczęściej wystarczający jest niski poziom rozdzielczości badań HLA w zakresie *loci* A, B i DRB1. Podczas selekcji niespokrewnionych dawców KKM zachodzi często konieczność wykonania badań dodatkowych *loci* lub badań A, B, DRB1 o wysokiej rozdzielczości, co jest czasochłonne. Przedłużający się dobór niespokrewnionego dawcy może spowodować przejście stanu pacjenta w fazę nieoptymalną dla leczenia transplantacyjnego i dlatego w procesie doboru preferowani są dawcy o poziomie wytypowania wyższym od wymagań minimalnych (>A,B,DRB1 o niskiej rozdzielczości). Ostateczne genotypowanie potwierdzające pary dawca-biorca musi być wykonane na odpowiednio wysokim poziomie rozdzielczości, pozwalającym na wykluczenie lub identyfikację niezgodności allelicznych w zakresie HLA-A, B, C, DRB1 i DQB1. W procesie doboru alogenicznego dawcy KKM należy stosować metody molekularne o optymalnej wiarygodności i rozdzielczości, odpowiednio do fazy doboru. Niejednoznaczne wyniki genotypowania HLA są w wielu przypadkach nie do uniknięcia, stąd konieczne jest pełne zrozumienie potencjalnego znaczenia niejednoznaczności dla ostatecznego wyniku transplantacji. Prawidłowe zastosowanie dostępnych metod genotypowania HLA o odpowiedniej rozdzielczości jest warunkiem przeprowadzenia doboru optymalnego dawcy. Optymalizacja doboru może pozwolić na dalszą poprawę przeżycia chorych po transplantacji komórek krwiotwórczych oraz na zmniejszenie częstości występowania groźnych powikłań immunologicznych i infekcyjnych.

Praca powstała przy współfinansowaniu w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki Nr N N402 351138.

## Literatura

- [1] Viollier R., Socie G., Tichelli A. i wsp.: Recent improvement in outcome of unrelated donor transplantation for aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 41: 45-50
- [2] Robinson J., Mistry K., McWilliam H. i wsp.: The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: D1171-1176
- [3] Holdsworth R., Hurley C.K., Marsh S.G. i wsp.: The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens*, 2009; 73: 95-170
- [4] Nowak J., Mika-Witkowska R., Graczyk-Pol E.: Genetic methods of HLA typing. W: *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies*, red.: M. Witt, M. Dawidowska, T. Szczepanski. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2012, 325-339
- [5] Dalva K., Beksac M. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology. *Methods Mol. Med.*, 2007; 134: 61-69
- [6] Schaffer M., Olerup O.: HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens*, 2001; 58: 299-307
- [7] Turner D.M., Poles A., Brown J. i wsp.: HLA-A typing by reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) using a capillary-based semi-automated genetic analyser. *Tissue Antigens*, 1999; 54: 400-404
- [8] Sanger F.: The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1975; 191: 317-333
- [9] Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D.: Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.*, 2009; 55: 641-658
- [10] King C.R., Scott-Horton T.: Pyrosequencing: a simple method for accurate genotyping. *Methods Mol. Biol.*, 2007; 373: 39-56
- [11] National Marrow Donor Program, web page, Edition: Sep 24, 2012, <http://www.marrow-donor.org/cgi-bin/DNA/dnatyp.pl>
- [12] Cano P., Klitz W., Mack S.J. i wsp.: Common and well-documented HLA alleles: report of the Ad-Hoc committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. *Hum. Immunol.*, 2007; 68: 392-417
- [13] Tiercy J.M., Nicoloso G., Passweg J. i wsp.: The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 40: 515-522
- [14] Nowak J., Graczyk-Pol E., Mika-Witkowska R., Zajko M., Rogatko-Koroś M., Sak-Budzisz J.: Skuteczność poszukiwania przez Ośrodek Instytutu Hematologii i Transfuzjologii niespokrewnionych dawców komórek krwiotwórczych w krajowych i zagranicznych rejestrach w latach 2001-2006 dla pacjentów z ostrymi i przewlekłymi białaczkami. *Postepy Nauk Med.*, 2007; 20: 298-303
- [15] Nowak J., Mika-Witkowska R., Siwik D., Zajko M., Łopacz P., Sak-Budzisz J.: Porównanie wyników typowania antygenów HLA klasy I uzyskanych metodami serologicznymi i molekularnymi – analiza błędów. *Acta Haematol. Pol.*, 2004; 35, 251-257
- [16] Jędrzejczak W.W.: Aktualne wskazania do przeszczepiania krwiotwórczych komórek macierzystych. *Acta Haematol. Pol.*, 2009; 40: 305-311
- [17] Nowak J.: Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 42 Suppl. 2: S71-76

1. Wykorzystanie genotypowania HLA w procedurach doboru ...

- [18] Nowak J., Wachowiak J.: Genetic basis of donor-recipient matching in allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. w: *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies*, red.: M. Witt, M. Dawidowska, T. Szczepanski. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2012, 237-254
- [19] Petersdorf E.W., Gooley T., Malkki M. i wsp.: Clinical significance of donor-recipient HLA matching on survival after myeloablative hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens*, 2007; 69 Suppl. 1: 25-30
- [20] Bray R.A., Hurley C.K., Kamani N.R. i wsp.: National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2008; 14: 45-53
- [21] Tiercy J.M., Nicoloso G., Passweg J. i wsp.: The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transplant.*, 2007; 40: 515-522
- [22] Nowak J., Mika-Witkowska R., Zajko M., Lopacz P.: Reliability of HLA-Cw data collected in unrelated bone marrow registry and their usefulness for preliminary donor selection. *Int. J. Immunogenet.*, 2005; 32: 319-322
- [23] Nowak J.: Dobór dawców komórek krwiotwórczych. w: *Podstawy immunogenetyki transplantacyjnej*, red.: J. Nowak, J. Fabijańska-Mitek. Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2012, 82-91
- [24] Marosz-Rudnicka A., Mika-Witkowska R., Graczyk-Pol E., Długokęcka A., Rogatko-Koroś M., Nowak J.: Immunogenetyczny dobór dawcy allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych. *Hematologia*, 2012; 3(3): 1-10
- [25] Kamani N., Spellman S., Hurley C.K. i wsp.: State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2008; 14: 1-6

# BANKI KRWI PEPOWINOWEJ W POLSCE I NA ŚWIECIE

Anna Maria Gronkowska, Elżbieta Urbanowska

*Pracownia Immunogenetyki, Bank Komórek Krwiotwórczych, Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, SP CSK WUM, Warszawa*

## Streszczenie

Krew pępowinowa oraz bogato ukrwione łożysko są elementami odpadowymi po urodzeniu dziecka, pomimo obecności w nich wyjątkowo dużej liczby krwiotwórczych komórek macierzystych. Unikalnością tych komórek jest zdolność do samoodnawiania się i różnicowania i z tego powodu stanowią niezwykle cenny materiał transplantacyjny, którego wykorzystanie podlega jednak pewnym ograniczeniom. Pobraną krew pępowinową, która po poddaniu preparatyce jest następnie zamrażana, przechowuje się na całym świecie w prywatnych lub publicznych tzw. bankach krwi pępowinowej. Założeniem autorek niniejszego opracowania jest pokazanie możliwie jak najobiektywniej i najszerzej aspektów przydatności zbierania i przechowywania długoterminowo, w głębokim zamrożeniu, w akredytowanych bankach krwi pępowinowej, jako szybko dostępnego źródła komórek macierzystych, przede wszystkim krwiotwórczych do ich użycia w transplantacjach alogenicznych od dawców spokrewnionych i niespokrewnionych.

*Słowa kluczowe:* krew pępowinowa, badania immunogenetyczne, HLA, transplantacja, CBU, banki krwi pępowinowej

## 2.1. Wstęp

Od przeszło 25 lat przeszczepianie alogenicznych komórek krwiotwórczych jest na świecie powszechnie uznaną metodą leczenia chorób nowotworowych krwi i innych oraz także różnych nieprawidłowości układu krwiotwórczego. Dla ponad połowy chorych, u których w ramach postępowania klinicznego rozważana jest transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych nie ma możliwości na znalezienie potencjalnego dawcy w rejestrach kandydatów. Znalezienie odpowiedniego dawcy wymaga całkowitej identyczności z biorcą w zakresie antygenów zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigens*, HLA) zarówno klasy I – *locus* A, B i C oraz klasy II – *locus* DRB1 i DQB1 i coraz częściej także DPB1 na poziomie wysokiej rozdzielczości, co stanowi nadal realny problem dla transplantologów [1].

## 2.2. Krwiotwórcze komórki macierzyste z krwi pępowinowej

Komórki macierzyste to niezróżnicowane, pierwotne komórki, z których powstają wszystkie komórki ludzkich tkanek, w tym również i krwi. Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) mają unikalną cechę samoodnowy i różnicowania się, dzięki czemu przez całe życie odtwarzana jest krew i układ odpornościowy. W związku z tą unikalną zdolnością można nimi zastąpić chory szpik w przypadku różnych chorób nowotworowych krwi (białaczki, chłoniaki i in.), wrodzonych niedokrwistości, nabytych anemii aplastycznych, niedoborów immunologicznych lub niektórych chorób metabolicznych i w ten sposób uratować życie choremu [2].

Krew pępowinowa i bogato ukrwione łożysko zawierają krwiotwórcze komórki macierzyste. Po urodzeniu dziecka są jednak elementami odpadowymi choć ze względu na unikalne cechy zawartych komórek stanowią niezwykle cenny materiał transplantacyjny. Pobrana krew pępowinowa poddawana jest od razu laboratoryjnemu opracowaniu – pomiarom objętości zebranego preparatu i zawartości w nim komórek CD34+, które są standardowym markerem krwiotwórczych komórek macierzystych. Następnie podlega ona wytypowaniu technikami na poziomie DNA pod względem antygenów zgodności tkankowej HLA w co najmniej trzech *loci*, tj. A, B i DR, ocenie ich żywotności w specjalnej hodowli oraz stanu bakteriologicznego preparatu. Po wykonaniu tych czynności, krew pępowinowa podlega głębokiemu zamrożeniu i przechowywana jest w specjalnych zbiornikach z ciekłym azotem, w których zbankowana oczekuje na wykorzystanie. Przeszczepienie odbywa się bezpośrednio po rozmrożeniu materiału przy łóżku chorego i bez uszkodzenia zdolności tych komórek do samoodnowy oraz umiejętności ponownego zasiedlenia w szpiku biorcy.

KKM pozyskane z krwi pępowinowej charakteryzują się dużą plastycznością immunologiczną, ponieważ są to tzw. komórki naiwne, czyli wykazujące większą dynamikę proliferacyjną oraz zdolność różnicowania. Doświadczalnie stwierdzono ich większą skłonność do transdyferencji i tworzenie większych kolonii [3, 4]. Mają także inne wymagania, co do czynników wzrostowych i zachowują ekspansywność i żywotność po długim okresie inkubacji *in vitro*. Wykazują mniejszą alloreaktywność limfocytów ze względu na niedojrzałość układu odpornościowego noworodka. Mimo początkowej immunologicznej niekompetencji limfocyty zachowują pełną zdolność do aktywacji i rozwijają sprawnie działającą linię obrony immunologicznej organizmu biorcy.

Dodatkowym aspektem wykorzystywania krwi pępowinowej jako źródła KKM jest brak wątpliwości natury etycznej, co do ich wykorzystania w medycynie w przeciwieństwie do embrionalnych komórek macierzystych. Brak jest również jakiegokolwiek ryzyka związanego z uzyskiwaniem takiego materiału transplantacyjnego od dawców. Metody pobierania krwi pępowinowej są całkowicie nieinwazyjne, bardzo proste i niedrogie, a zdeponowana w banku jednostka jest dostępna do natychmiastowego użycia w celu przeszczepienia. Ponadto, co jest niezwykle ważne brak w niej obecności tych komórek nowotworowych, które

powstają w późniejszym okresie życia pod wpływem środowiska zewnętrznego. Ze względu na brak komórek immunokompetentnych znacznie mniejsze jest ryzyko powikłań zakaźnych oraz wystąpienia reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) ze względu na większą tolerancję pod względem antygenów zgodności tkankowej [5]. Uważa się, że krwiotwórczych komórek macierzystych w krwi pępowinowej jest ich nawet do 10 x więcej niż w szpiku czy krwi obwodowej. Wykazano również, że wśród komórek krwi pępowinowej występuje większy odsetek komórek macierzystych niżej uorganizowanych w hierarchii krwiotworzenia oraz, że wykazują one większy potencjał do ekspansji i proliferacji w porównaniu z komórkami szpiku lub krwi obwodowej [6, 7]. Zatem mniejsza liczba komórek krwiotwórczych jest w stanie zrekonstruować chory szpik u biorcy, co do niedawna stanowiło istotne ograniczenie, jeśli chodzi o zastosowanie jednostek gromadzonych w bankach krwi pępowinowej na świecie.

### 2.3. Transplantacje krwi pępowinowej

Pierwszego przeszczepienia alogenicznego jednostki krwi pępowinowej (CBUT) z powodzeniem dokonała Professor Eliane Gluckman w 1988 u dziecka z anemią Fanconi'ego w klinice w Paryżu [7]. Dawcą była identyczna pod względem antygenów HLA siostra. Pacjent z pełną rekonstrukcją hematopoetyczną i limfoidalną do dziś czuje się dobrze. Ten pierwszy sukces otworzył drogę do nowego pola w dziedzinie alogenicznych transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych [6–8]. Od tego też momentu datuje się początek tworzenia i organizacji banków krwi pępowinowych.

Istnieje jednak powszechna opinia, że objętość jednej jednostki krwi pępowinowej wahająca się na ogół od kilkudziesięciu mililitrów do co najwyżej 100 ml, zawierająca niewiele ponad miliard hematopoetycznych komórek wystarczać może do bezpiecznego przeszczepienia i odnowy krwiotworzenia tylko u dziecka o masie ciała do 30 kg. Jest to zdecydowanie za mało komórek, aby efektywnie zabezpieczyć krwiotworzenie u dorosłego pacjenta po mieloablacji, to znaczy wyeliminowaniu chemioterapią komórek nowotworowych. A jak dotąd wszystkie próby *in vitro* tzw. ekspansji prowadzone intensywnie w latach 90 końca XX wieku, czyli namnożenia krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej i uzyskiwania w ten sposób większej liczby komórek nie powiodły się i wzbudzają coraz mniejsze zainteresowanie naukowców [4]. Zwiększenia liczby komórek krwiotwórczych dokonano więc z powodzeniem poprzez wykorzystanie kilku jednostek CBU do zabiegu przeszczepienia u dorosłych chorych [9–12].

Pierwszy zabieg przeszczepienia krwi pępowinowej w Polsce wykonali w 1994 r. u chłopca z ostrą białaczką szpikową prof. A. Lange we współpracy z prof. W.W. Jędrzejczakiem. Natomiast w 2003 r. w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych WUM dokonano przeszczepienia więcej niż jednej jednostki krwi pępowinowej u 21-letniego chłopaka z ostrą białaczką oporną na chemioterapię, dla którego nie można było znaleźć dawcy niespokrewnionego w realnie szybkim czasie ze względu na rozwój choroby i konieczności szybko przeprowadzonego zabiegu z punktu widzenia jego skuteczności [13]. Podano



## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie

dwie jednostki krioprezzerwowanej krwi pępowinowej różniące się łącznie trzema antygenami HLA z biorcą. Różnice dotyczyły *locus* A oraz *locus* DR. Całkowita liczba przeszczepionych TNC wynosiła  $2,2 \times 10^7$ /kg m.c. biorcy, a komórek CD34  $0,5 \times 10^7$ /kg m.c. biorcy. Łączna liczba przeszczepionych prekursorowych komórek krwiotwórczych tworzących kolonie erytroidalne wynosiła  $2,2 \times 10^4$ /kg m.c. biorcy, a liczba komórek prekursorowych tworzących kolonie granulocytarno-makrofagowe wynosiła  $2,25 \times 10^4$ /kg m.c. biorcy. Biorca posiadał grupę krwi O Rh dodatnią, natomiast pierwsza jednostka krwi pępowinowej miała grupę A Rh ujemną, a druga jednostka grupę krwi B Rh dodatnią. Chory zmarł w 103 dobie po przeszczepieniu na skutek objawów niewydolności oddechowej. W badaniu cytologicznym wykonanym w setnej dobie po przeszczepieniu stwierdzono bogatą komórkową i prawidłową cytologicznie szpik. W ramach analizowania zastosowanego postępowania klinicznego u chorego wykonano badanie typowania HLA w celu określenia, które komórki macierzyste zregenerowały szpik. Stwierdzenie po przeszczepieniu dwóch różnych pod względem HLA CBU obecności antygeny jednego z antygenów HLA DRB1 na limfocytach chorego, którego przed transplantacją nie określono, wskazuje na rekonstrukcję szpiku przez KKM pochodzące z jednej z przeszczepionych jednostek [13]. Na świecie po raz pierwszy wykonano podobny zabieg transplantacji dwóch CBU u dorosłego chorego w 2001 r. w USA [35].

Z kolei w marcu 2007 r. pierwszy raz użyto do transplantacji krwi pępowinowej, która wcześniej została pobrana, przetworzona i przechowywana w prywatnym banku od 2004 r. Przeszczepienie wykonano w Klinice Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu u 8-letniej siostry noworodka, dziewczynki chorej na neuroblastom, która żyje dotychczas.

W ostatnich latach odnotowuje się coraz większe wykorzystywanie w transplantologii macierzystych komórek krwiotwórczych pozyskanych z krwi pępowinowej i zdeponowanych w stanie głębokiego zamrożenia w tzw. bankach krwi pępowinowej. Co prawda znaczącą przewagą w przypadku przeszczepiania komórek krwiotwórczych pochodzących z krwi pępowinowej jest akceptowalność mniejszego zakresu zgodności HLA pomiędzy dawcą a biorcą związanego z niedojrzałością tych komórek i nie wykształcenia na ich powierzchni markerów zgodności tkankowej. W przypadku transplantacji krwi pępowinowej dopuszczalna jest zgodność w zakresie czterech *loci* A, B, C i DRB1, a nie co najmniej jednej niezgodności, jak w przypadku dobrania żywego dawcy krwiotwórczych komórek ze szpiku lub z krwi obwodowej. Przeszczepianiu komórek krwi pępowinowej z reguły towarzyszy słabszy przebieg choroby „przeszczep przeciw gospodarzowi” (GvHD) a i częściej efekt „przeszczepu przeciw białaczce” (GvLR) bardzo pożądanego u niektórych chorych. Oba te czynniki mają istotne znaczenie w podnoszeniu zainteresowania zbieraniem i „bankowaniem” jednostek krwi pępowinowej, co umożliwi łatwiejszą dostępność do takiego materiału transplantacyjnego, zwłaszcza że jest to materiał już opracowany pod względem laboratoryjnym. Oznacza to, że macierzyste komórki krwiotwórcze są przebadane pod względem bakteriologicznym i wirusologicznym, policzone oraz sprawdzony został ich potencjał biologiczny. Wobec tego zostało wykazane naukowo, że

mniejsza liczba komórek CBU jest w stanie zrekonstruować chore krwiotworzenie u biorcy, co dotychczas uważano na świecie za podstawowe ograniczenie ich zastosowania. W ostatnim czasie pojawiło się przypuszczenie, że sposobem ominięcia kwestii małej liczby komórek krwiotwórczych w pozyskiwanych przez banki jednostkach CB może być przeszczepienie równolegle kilku jednostek i w ten sposób zwiększenie liczby multipotencjalnych komórek w materiale transplantacyjnym. Obecnie na świecie wykonano już ponad 1500 takich transplantacji [14]. Zastosowanie więcej niż jednej CBU wykazały, że prowadzi ono do szybszej odnowy układu krwiotworzenia u biorcy przeszczepu, pomimo że wszczepieniu ulega zawsze tylko jedna z jednostek, co wykazano badaniem chimeryzmu potransplantacyjnego [15]. Badanie chimeryzmu obrazuje na poziomie genetycznym, które komórki rekonstruują zniszczone komórki biorcy. Okazało się, że u pacjenta po transplantacji wykrywane są tylko markery charakterystyczne dla jednej z nich [13, 16]. Mechanizmy leżące u podstaw tej obserwacji nie są znane. Badania z 2005 roku dowiodły, że komórki CBU, która nie uległa wszczepieniu spełniają rolę pomocniczą dla komórek wszczepiających się. Komórki mezenchymalne obecne również w CBU prawdopodobnie wspomagają wszczepienie komórek macierzystych jednej z kilku jednocześnie podawanych jednostek i to tej, która zawiera większą liczbę limfocytów T CD3+. Komórki mezenchymalne mogą wykazywać działanie supresyjne na limfocyty T CD3+ [17].

## 2.4. Wybór źródła KKM do transplantacji

Kryteria wyboru materiału transplantacyjnego zostały opracowane i zaproponowane przez V. Rocha i E. Gluckman [18]. Zgodnie z wytycznymi Europejskiej Grupy Przeszczepiania Szpiku EBMT do przeszczepienia alogenicznych KKM wybór rodzaju materiału transplantacyjnego zależy przede wszystkim od zgodności w HLA. W przypadku krwi pępowinowych dla CBU dotyczy to zgodności w zakresie HLA A, B i DRB1 na poziomie alleli, przy czym zgodność w HLA C jest nie brana pod uwagę. Także zgodność alleliczna w HLA A i B generalnie nie jest rozważana. Preferowana jest bardziej różnica w A lub B niż różnica w DRB1 [5, 22]. Ponadto, niezbędna jest określona liczba KKM w materiale transplantacyjnym, w tym liczba całkowita komórek jądrzastych w zależności od stopnia zgodności z chorymi w zakresie HLA:

- przy zgodności 5/6 min.  $2.5 \times 10^7$ /kg TNC przed mrożeniem –  $2.0 \times 10^7$ /kg (po rozmrożeniu),
- przy zgodności 4/6 min.  $3.5 \times 10^7$ /kg TCN przed mrożeniem –  $3.0 \times 10^7$ /kg (po rozmrożeniu),

oraz liczba komórek CD34  $1.2 - 1.7 \times 10^5$ /kg masy ciała biorcy. W Tabeli 2.1 przedstawiono wartości w różnych materiałach transplantacyjnych dla krwiotwórczych komórek macierzystych uwzględniające liczby komórek jednojądrzastych CD3 i CD34 pozytywnych oraz wymagania dotyczące biorcy.

Wiadomo, że najlepszym dawcą jest rodzony brat albo siostra, ale nie wszyscy chorzy mogą mieć takiego klasycznego dawcę. Zgodnie z prawami dziedziczenia

## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie

Tabela 2.1: Wartości krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) w różnych materiałach transplantacyjnych [27].

Rodzaj KKM	Objętość (kg m.c. dawcy)	Zawartość CD34+ (liczba kom./kg m.c. biorcy)	Zawartość CD3+ (liczba kom./kg m.c. biorcy)	Dawka (liczba kom./kg m.c. biorcy)
Szpik	10-20 ml/kg	$2-3 \times 10^6$ /kg	$25 \times 10^6$ /kg	$>2 \times 10^8$ TNC/kg
Krew obwodowa po mobilizacji	150-400 ml	$8 \times 10^6$ /kg	$250 \times 10^6$ /kg	$5-10 \times 10^6$ CD34+/kg
Krew pępowinowa	80-160 ml	$0.2 \times 10^6$ /kg	$4 \times 10^6$ /kg	$>3 \times 10^7$ TNC/kg

tylko co czwarty brat lub siostra odziedziczy te same geny HLA od obojga rodziców. Zależnie od wielkości rodzin, chory częściej lub rzadziej może otrzymać komórki krwiotwórcze od dawcy spokrewnionego. Statystyki mówią, że tylko około 35 % chorych ma zgodnego w HLA rodzinnego dawcę komórek krwiotwórczych. Pozostali chorzy wówczas zostaliby pozbawieni możliwości zastosowania u nich takiej terapii. Przeszło 60% chorych zależnych jest od niespokrewnionego dawcy, inaczej nazywanego dawcą alternatywnym i muszą oczekiwać na znalezienie niespokrewnionego dawcy o identycznych antygenach HLA w rejestrach na świecie.

Transplantacje krwi pępowinowej są całkowicie bezpieczne, jednak mają ograniczenie spowodowane ilością zbieranego materiału. Krew taką pobiera się zawsze po odpięciu noworodka. Pozostaje ona w łożysku i odciętej pępowinie, a pobranie jej nie wyrządza jakiegokolwiek krzywdy ani matce ani dziecku. Zwykle udaje się pozyskać małe objętości około 100 ml lub nieco więcej. Z tego względu najlepsze wyniki przeszczepiania uzyskuje się u biorców, którymi są dzieci z chorobami nienowotworowymi, ważącymi do 10 kg. W ostatnim okresie przeszło 7% transplantacji w Europie odbywa się z zastosowaniem alogenicznych KKM pochodzących z krwi pępowinowej [7, 19, 20, 23].

Zgodnie z wytycznymi Europejskiej Grupy Przeszczepiania Szpiku do przeszczepienia alogenicznych komórek krwiotwórczych kwalifikowani są chorzy z różnymi rozpoznaniem. Lista chorób, które leczone są transplantacjami krwiotwórczych komórek macierzystych stale się wydłuża. Jednocześnie zabieg taki powinien być elementem planowanego leczenia od momentu rozpoznania choroby. Preferowany jest zabieg od najlepszego z możliwych dawców ze wszystkich dostępnych źródeł [22].

### 2.5. Współpracujące organizacje międzynarodowe

Na świecie tylko dla około 40% chorych wymagających transplantacji udaje się znaleźć potencjalnego dawcę komórek krwiotwórczych. Zasadniczym źródłem poszukiwania są rejestry niespokrewnionych dawców komórek krwiotwórczych i banki krwi pępowinowej tj. placówki przechowujące wytestowane pod względem tankowym i infekcyjnym jednostki krwi pępowinowej na świecie.

W 1974 r. w Maastricht w Holandii ustanawiając wspólnie z naukowcami i lekarzami uczestniczącymi w klinicznych transplantacjach komórek krwiotwórczych powołano do życia organizację – European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) - w celu dzielenia się swoimi doświadczeniami i podnoszeniem wiedzy. Organizacja ta bazuje na umowie przedstawicieli krajów zaangażowanych w wykonywanie tego rodzaju zabiegów i funkcjonuje na zasadzie non-profit. Zarząd EBMT odpowiada za wszystkie wypracowane decyzje i zasady, które podejmuje w drodze głosowania. Jej członkami są poszczególne aktywne ośrodki wykonujące każdego rodzaju transplantacje krwiotwórczych komórek macierzystych oraz inne instytucje zaangażowane w opiekę dawców i biorców. Rozróżnia się pełne członkostwo i tzw. towarzyszące, związane ze raportowaniem danych o transplantacjach do prowadzonego przez EBMT rejestru. Osoby aktywnie zaangażowane w dziedzinie transplantacji szpiku mogą ubiegać się o indywidualne członkostwo w EBMT. Nowi członkowie przyjmowani są po przesłaniu do biura EBMT formularza wniosku o członkostwo. Wniosek zawiera podpisy dwóch osób z ośrodków, które już posiadają członkostwo w EBMT. Po przyjęciu wniosku, sekretarz EBMT przyznaje tymczasowe członkostwo oraz kod identyfikacyjny dla ośrodka tzw. Centre Identification Code (CIC). Na odbywającym się okresowo walnym zgromadzeniu sekretarz przedstawia wszystkie wnioski o członkostwo i po ich zatwierdzeniu na posiedzeniu ośrodek staje się odpowiednio - pełnym członkiem EBMT, towarzyszącym lub indywidualnym.

W 1988 r. z inicjatywy Immunology Working Party działającej w ramach europejskiej organizacji transplantacji szpiku EBMT rozpoczęła działalność I-sza edycja internetowej bazy danych o dawcach komórek hematopoetycznych. Komputerowa baza immunogenetycznych danych o antygenach zgodności tkankowej zdrowych ochotników na całym świecie została opublikowana na stronie internetowej Bone Marrow Donor Worldwide (BMDW z biurem w Leiden, Holandia) w lutym 1989 r. i zawierała dane o 155 000 dawców z 8 rejestrów.

Co miesiąc rejestry zrzeszone w ramach BMDW przesyłają aktualizację zawartości swoich baz elektronicznych do centralnego serwera. Organizacja BMDW stanowi dobrowolny wspólny wysiłek rejestrów niespokrewnionych dawców komórek krwiotwórczych i banków krwi pępowinowej na świecie. Kierownictwo tej organizacji stanowi jeden przedstawiciel z każdego rejestru dawców albo banku krwi pępowinowej i spotyka się dwa razy do roku w celu omówienia osiągnięć i niezbędnych aktualnych zagadnień organizacyjnych, prawnych i administracyjnych.

Ośrodki zajmujące się poszukiwaniem i doбором materiału transplantacyjnego korzystają na stronie internetowej [www.bmdw.org](http://www.bmdw.org) z wyszukiwarki, pozwalającej na znalezienie wszystkich dostępnych na świecie kandydatów na dawców komórek krwiotwórczych dla potrzebującego chorego pod warunkiem, że znane są HLA A, B i DR chorego. Uprawnieni użytkownicy z tych ośrodków transplantacyjnych lub rejestrów i banków otrzymują hasło i kod dostępu do bazy w celu wyłonienia odpowiedniego tj. w pełni zgodnego pod względem HLA, dawcy niespokrewnionego lub jednostki krwi pępowinowej, co następnie wymaga akceptacji ośrodka transplantacyjnego wykonującego zabieg. Na szybkość tego działania

## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie

Tabela 2.2: Wynik przeszukania jednostek krwi pępowinowych w bazie BMDW (dane BMDW z dn. 27 sierpnia 2012, <http://www.bmdw.org/>).

A	B	C	DRB1	DQB1	Reg	#	Additional details	TNC	Vol.	CD34+MN				
2402	2601	3502	4402	0303	0401	1103	1301	0301	0603	ID	(10 <sup>7</sup> )	(ml)	(10 <sup>6</sup> )	(10 <sup>7</sup> )
<b>Potentially (Allele) Matched:</b>										<b>1</b>				
24XX	26XX	4402	35XX			11XX	13XX			ICB	MICB-0199001322	110		
										<b>Italy CORD #</b>				
<b>HLA-DR Allele/Split Antigen Mismatched:</b>										<b>2</b>				
24XX	26XX	44XX	35XX			<b>1104</b>	1301			AUCB	390094259	86	95	1.3
24	26	44	35			<b>12XX</b>	13XX			SECB	C08-080	84	33	
<b>HLA-A Antigen Mismatched:</b>										<b>19</b>				
<b>02XX</b>	24XX	44XX	35B0			11XX	13XX			CSCB	CZ44408D	98	105	
24XX		44XX	35XX			11XX	13XX			ILCB	113114	144	156	
<b>01XX</b>	24XX	44XX	35XX			11XX	13XX			ICB	MICB-0120001626	108		
24XX	<b>29XX</b>	44XX	35XX			11XX	13XX			ECB	SPUCMAD0011828	88	65	
24XX	<b>29XX</b>	44XX	35XX			11XX	13XX			ECB	SPUCMAD0008046	67	148	
<b>2</b>	24	44	35			11XX	13XX			ICB	03F15/1270/02	157		
24	<b>11</b>	44	35			11XX	13XX			I3CB	SHD070138	145	16	
<b>1</b>	24	44	35			11XX	13XX			I3CB	SHD090028	117	18	
24	<b>31</b>	44	35			11XX	13XX			I3CB	SHD070147	107	16	
<b>2</b>	24	44	35			11XX	13XX			SECB	C08-226	70	28	
<b>2</b>	24	44	35			11XX	13XX			ICB	0698013963	59		
24	<b>32</b>	44	35			11XX	13XX			ICB	MICB0198Q3D6895	56		
<b>2</b>	26	44	35			11XX	13XX			ECB	SPUCVAL0003927	54	25	
24	<b>28</b>	44	35			11XX	13XX			ICB	05PDCB06698	142		
<b>2</b>	24	44	35			11	13			CNCB	A0007544	95	30	
24	<b>33</b>	44	35			11	13			CNCB	A0000126	70	29	
24	<b>33</b>	44	35			11	13			KRCB	AL200707120010	67		
24	<b>33</b>	44	35			11	13			KRCB	MP2228	58		
<b>2</b>	24	44	35			11	13			NYCB	111976	29	57	
<b>HLA-B Antigen Mismatched:</b>										<b>16</b>				
24XX	26XX	<b>38XX</b>	35XX			11XX	13XX			ICB	044338	129		
24XX	26XX	<b>38XX</b>	35XX			11XX	13XX			ILCB	158600	126		
24XX	26XX	<b>38XX</b>	35XX			11XX	13XX			ILCB	141398	89		
24XX	26XX	<b>52XX</b>	44XX			11XX	13XX			ILCB	163380	88		
24XX	26XX	<b>38XX</b>	35XX			11XX	13XX			ILCB	122528	80	82	
24	26	44	<b>15</b>			1103	1301			NYCB	602662	90	134	5.8

istotnie wpływa częstość występowania podobnych antygenów HLA w określonej populacji.

Do stałych inicjatyw BMDW należy maksymalizowanie szansy na znajdowanie potencjalnych i dostępnych dawców komórek macierzystych albo jednostek krwi pępowinowej poprzez dostarczanie nowozrekrutowanych i opisanych fenotypowo HLA dawców i jednostek krwi pępowinowej dostępnych na całym świecie. Ponadto, należy też dostarczanie istotnych powszechnych informacji z myślą o pacjencie, a także przedstawianie statystyk mówiących o wzroście zasobów różnych rejestrów dawców i banków CB, opisanych pod względem HLA dawców. W przypadku banków CB każda zgromadzona jednostka opisana zostaje również w zakresie jej objętości i zawartości komórek jednojądrzastych. Przykładowy wynik przeglądu internetowej bazy BMDW dla biorcy o określonym HLA przedstawia Tabela 2.2.

Światowa baza dostępnych dawców komórek krwiotwórczych BMDW funkcjonuje w zgodzie z zaleceniami ustalonymi przez Europejską Fundację Dawców - Eurodonor Foundation oraz pod auspicjami światowej organizacji dawców szpiku - World Marrow Donor Association (WMDA z siedzibą w Leiden, Holandia). WMDA powstała w 1989 r. jako międzynarodowa sieć rejestrów dawców ko-

mórek krwiotwórczych i banków krwi pępowinowej do ustanawiania standardów jakości. Dodatkowo wpływa na rozwój transplantacji poprzez rekrutację, testowanie, pobieranie, przechowywanie, dobieranie oraz transport komórek krwiotwórczych. Jest międzynarodowym przedsięwzięciem, w którym współpracują różne organizacje i osoby zaangażowane w transplantację komórek krwiotwórczych. Misją tej organizacji jest popieranie międzynarodowej współpracy w celu ułatwienia dostępności i wymiany wysokiej jakości komórek krwiotwórczych użytych do transplantacji dla pacjentów na całym świecie. Jednocześnie WMDA strzeże interesów wszystkich dawców w rejestrach międzynarodowych oraz zajmuje się promowaniem dawstwa szpiku. Posiada zarząd, który jest ciałem administracyjnym odpowiedzialnym za całą działalność i kierunki wytyczone przez stowarzyszenie. Utrzymuje się z dobrowolnych składek zrzeszonych organizacji. Aktualnie przy WMDA akredytowanych jest 17 rejestrów niespokrewnionych dawców komórek krwiotwórczych i banków krwi pępowinowej, do których należy 83% wszystkich dawców w BMDW. WMDA poprzez definiowanie szczegółowych wymogów zdrowotnych w stosunku do dawców pozwala utrzymać zachowanie wysokich standardów bezpieczeństwa zarówno biorcy jak i dawcy w procesie transplantacji. Na podstawie opracowanych i publikowanych wytycznych (Accreditation Policies and Procedures, International Standards for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Registries, Nov. 2009) realizowane są dążenia tej organizacji dla ujednolicenia zasad etycznych, technicznych, medycznych i finansowych stosowanych przez współpracujące ośrodki, a także dla procesów rekrutacji potencjalnych dawców szpiku.

W 1995 r. pod kierownictwem Professor Eliane Gluckman, w ramach własnego projektu rozpoczął swoją działalność Eurocord. Eurocord został powołany również z inicjatywy europejskiej grupy przeszczepiania szpiku EBMT i jest naukową organizacją międzynarodową zbierającą dane o wykonywanych na świecie przeszczepieniach krwiotwórczych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. Misją Eurocordu było ustanowienie warunków współpracy pomiędzy bankami krwi pępowinowej (zrzeszonymi w Netcord) i ośrodkami przeszczepiania w ramach EBMT oraz bazą danych immunogenetycznych BMDW. Dzięki tej współpracy zbierano dane kliniczne o pacjentach po przeszczepieniach CBU, a następnie przeanalizowano i przekazano je do EBMT, co pozwoliło budować bazę danych o skuteczności wykonywania takich procedur medycznych. Od marca 1988 r. do 2009 r. zebrano 5223 przypadków transplantacji CBU, które zostały przeanalizowane i zebrane w archiwum Eurocordu. Dane pochodziły z 238 ośrodków przeszczepowych należących do EBMT (68% z przypadków) i z 199 ośrodków spoza EBMT (29% z przypadków) z 47 krajów europejskich i pozaeuropejskich. Osiągnięciem tego projektu jest stworzenie dużego archiwum, które zostało sfinansowane z trzech kolejnych programów Unii Europejskiej.

W 1998 r. powstała Fundacja NetCord, w celu kontroli jakości i standaryzacji gromadzenia CBU. Misją tej międzynarodowej organizacji jest promocja wysokiej jakości produktów krwi pępowinowej w drodze ustanowienia światowych standardów i akredytacji oraz popieranie i ułatwianie zastosowania CBU do trans-

plantacji przez promocję badań laboratoryjnych i klinicznych zapewniających profesjonalność oraz edukację społeczną. Fundacja NetCord liczy 31 członków.

Organizacja Eurocord stanowi kliniczną kontrolę nad danymi i jednocześnie prezentuje czynne poszukiwania najlepszych dawców komórek krwiotwórczych CBU w bankach zrzeszonych w ramach NetCord. Umożliwiło to dokonanie więcej niż 50 publikacji w medycznych czasopismach o wysokim naukowym poziomie.

W celu opracowania i oceny przeszczepień krwi pępowinowej dla potrzeb i wspólnego działania EBMT od 1996 r. Eurocord zajmuje się badaniem właściwości krwiotwórczych komórek progenitorowych i przekazywania genów w komórkach krwi pępowinowej oraz oceną funkcji układu immunologicznego limfocytów krwi pępowinowej. Ponadto, ustanowieniem europejskiego rejestru chorych leczonych przeszczepieniem komórek macierzystych z krwi pępowinowej i ustaleniem protokołu projektu porównującego transplantacje CBU, jako alternatywnego źródła KKM, z metodami konwencjonalnymi uzyskiwania ich z krwi obwodowej lub szpiku dawcy [21, 22]. Natomiast kontrola jakości jednostek krwi pępowinowej dostarczanej z europejskich banków CBU odbywa się w ramach działalności NetCord. Fundacja NetCord z siedzibą w Leiden, Holandia, jest międzynarodową siecią non-profit banków CBU utworzoną w celu wspierania tworzenia wysokiej ich jakości. Międzynarodowe normy w zakresie zbierania, przetwarzania, testowania, bankowania i udostępniania CBU opracowywane są przez FACT (Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy, założona w 1996 roku) w celu stworzenia spójnego systemu akredytacji na całym świecie także zgodnym z obowiązującymi przepisami krajowymi. Pierwsze wydanie norm opublikowano we wrześniu 1996 roku. Program został opracowany przez dr Phyllis Warkentin, dyrektora medycznego FACT. Pierwsze kontrole rozpoczęły się we wrześniu 1996. Obecne standardy działania banków krwi pępowinowej zostały opracowane przez NetCord, organizację zrzeszającą banki z USA, Europy, Japonii i Australii, która we współpracy z FACT opracowuje normy spójnego systemu akredytacji i publikuje je w kolejnych edycjach, jako międzynarodowe standardy dla bankowania CBU oraz jako podręcznik do akredytacji tworzonych banków CBU. Obecnie wydana jest najnowsza piąta edycja instrukcji akredytacyjnej FACT-JACIE (Joint Accreditation Committee International Society for Cellular Therapy and European Group for Blood Marrow Transplantation, - JACIE – ISCT & EBMT) z międzynarodowymi normami dotyczącymi komórkowych programów terapeutycznych. Te dwa podręczniki - Cellular Therapy Accreditation Manual oraz International Standards for Cellular Therapy Product Collection, Processing, and Administration - wydane w V edycji w 2012, dostarczają wyczerpująco wytycznych zarówno dla wnioskodawców, jak i kontrolerów w zakresie akredytacji i dokładnie precyzują obowiązujące procedury. Przedstawione są w nich wymagania, a także wyjaśnienia dotyczące sensu i uzasadniające określone poszczególne normy oraz przykłady i alternatywne podejścia, które mają na celu zapewnienie minimalnych wytycznych dla programów, urządzeń oraz osób wykonujących transplantacje komórkowe.

## 2.6. Banki krwi pępowinowych

Ustanowienie pierwszych banków krwi pępowinowej w Nowym Jorku, Paryżu, Mediolanie i Dusseldorfie nastąpiło w latach 1992-1993. W latach wcześniejszych odnotowywane były liczne obserwacje kliniczne dotyczące łżejszego przebiegu GvHD po transplantacjach CBU niezgodnych w HLA.

Na całym świecie materiał jest przechowywany w prywatnych lub państwowych bankach krwi pępowinowej. Prywatne banki krwi pępowinowej przechowują ją w celu przeszczepienia autologicznych komórek macierzystych krwi. Za pobranie, opracowanie laboratoryjne, zamrażanie i przechowywanie takiej jednostki płacą rodzice dziecka, zachowując w ten sposób pełne prawa do jej własności.

Pierwszy publiczny bank krwi pępowinowej został utworzony w 1993 r. [25]. Publiczne banki krwi pępowinowej zbierają wyselekcjonowane jednostki krwi pępowinowej do wykorzystania w alogenicznych transplantacjach [23]. Swoje bazy danych o zgromadzonych jednostkach tworzą na ogół wspólnie z rejestrami niespokrewnionych dawców szpiku. Dane przekazują centralnej bazie BMDW, która następnie poprzez internet udostępnia ośrodkom poszukującym zgodnych pod względem HLA dawców komórek krwiotwórczych dla chorych na całym świecie. Baza BMDW działa w systemie comiesięcznej aktualizacji i posiada na dzień 27.08.2012 (Tabela 2.3) dane immunogenetyczne 20 380 925 dawców komórek krwiotwórczych w tym: 19 838 400 dotyczących dawców szpiku oraz o ok. 542 225 jednostkach krwi pępowinowej. Dane te do ogólnoświatowej internetowej bazy danych BMDW dostarczane są z 66 rejestrów dawców niespokrewnionych z 48 krajów oraz z 46 banków krwi pępowinowych z 30 krajów. Aktualnie jest 806 użytkowników tej bazy - odbiorców *on-line* z 499 autoryzowanych ośrodków - organizacji medycznych, które zajmują się poszukiwaniem i doborem pod względem zgodności w układzie HLA dawców komórek krwiotwórczych. Udostępnianie bazy danych BMDW odbywa się na zasadzie *on-line* po uzyskaniu kodu dostępu i hasła do bazy przez ośrodki rekrutujące kandydatów na dawców do rejestru oraz klinik transplantacyjnych.

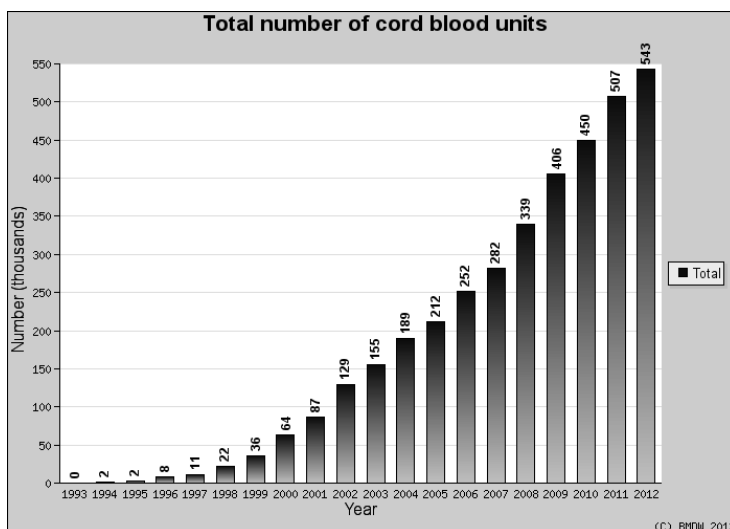
Od momentu doniesienia w 1988 r. o wykonaniu pierwszej transplantacji krwi pępowinowej w Paryżu datuje się początek tworzenia i organizacji banków krwi pępowinowej, w których ilość zebranych opracowanych laboratoryjnie i zamrożonych jednostek rokrocznie przybywa. Rycina 2.1 przedstawia wzrost liczby

Tabela 2.3: Struktura Bone Marrow Donor Worldwide (dane BMDW z dn. 27 sierpnia 2012, <http://www.bmdw.org/>).

<b>Uczestnicy:</b>	66 Rejestrów Dawców z 48 krajów
	> 19 838 400 potencjalnych dawców
	46 Banków Krwi Pępowinowej z 30 krajów
	ok. 542 225 jednostek krwi pępowinowych
<b>Razem</b>	20 380 925 dawców komórek krwiotwórczych
<b>Użytkownicy:</b>	806 odbiorców „on-line” z 499 autoryzowanych ośrodków



## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie



Rycina 2.1: Ilość zgromadzonych CBU w bazie BMDW od początku (dane BMDW z dn. 27 sierpnia 2012, <http://www.bmdw.org/>).

bankowanych CBU w bazie BMDW od początku do dzisiaj. Głównym celem działania wszystkich banków krwi pępowinowej jest gromadzenie jak największej ilości wyselekcjonowanych i przetestowanych pod względem tkankowym i infekcyjnym jednostek krwi pępowinowej, następnie ich zamrożenie i przechowywanie w ciekłym azocie w specjalnych kontenerach [23, 24].

W Tabeli 2.4 przedstawiono zasoby wybranych banków CBU na świecie. Dane te pochodzą z uaktualnionej dn. 27 sierpnia 2012 bazy BMDW (<http://www.bmdw.org/>).

### 2.7. Badania i preparatyka w celach transplantacyjnych bankowanej CBU

Procedurę pozyskiwania, badania i preparowania komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej można podzielić na następujące etapy: pobranie krwi pępowinowej, oddzielenie komórek jądrzastych od erytrocytów, granulocytów i płytek krwi, zagęszczenie zawiesiny komórek jądrzastych, wśród których są obecne komórki krwiotwórcze, krioprezervację tych komórek, ich przechowywanie oraz rozmrożenie z ewentualnym usunięciem czynnika krioprotektorującego bezpośrednio przed ich zastosowaniem u chorego. Czynności, które obejmują wyizolowanie komórek jądrzastych z krwi pępowinowej, ich przechowywanie i rozmrażanie muszą być wykonywane w taki sposób, aby gwarantowały najmniejsze ich straty, zarówno w czasie obróbki, jak też później w trakcie ich wieloletniego przechowywania [24]. Jest to o tyle istotne, że zwykle pobiera się niewielką objętość krwi pępowinowej - ok. 80 do 150 ml, zawierającą ograniczoną liczbę komórek krwiotwórczych, która wystarcza do ustanowienia krwiotworzenia w zasadzie

## 2.7. Badania i preparatyka w celach transplantacyjnych bankowanej CBU

Tabela 2.4: Zasoby wybranych banków CBU w bazie BMDW (dane BMDW z dn. 27 sierpnia 2012, <http://www.bmdw.org/>).

Registry / Registry Code	Total	ABDR		DNA	
			% Typed	Class I	Class II
Argentina CORD ARCB	1,973	1,970	99.8	1,973	1,970
Australia CORD # AUCB	24,809	24,809	100.0	19,558	24,809
Austria CORD ACB	1,308	1,308	100.0	1,308	1,308
Belgium CORD ## BCB	16,583	16,583	100.0	14,358	16,535
Czechia CORD CSCB	3,884	3,884	100.0	3,769	3,882
Duesseldorf CORD # DUCB	17,316	17,316	100.0	13,644	17,315
Finland CORD FICB	3,308	3,308	100.0	1,532	3,308
France CORD ## FCB	20,408	20,408	100.0	15,110	19,924
Germany CORD DCB	14,407	14,407	100.0	13,037	14,400
Greece-Athens CORD ATCB	1,251	1,251	100.0	0	0
Greece-Thessaloniki CORD TSCB	319	319	100.0	0	0
Italy CORD ICB	28,247	28,245	100.0	19,924	28,243
Poland-POLTransplant CORD W3CB	719	719	100.0	636	718
Russia-Samara CORD SRCB	4,598	4,598	100.0	4,598	4,598
Slovakia CORD SKCB	1,726	1,726	100.0	1,173	1,179
Spain CORD ## ECB	54,938	54,938	100.0	42,114	51,005
Sweden CORD SCB	2,238	2,238	100.0	2,238	2,238
Switzerland CORD CHCB	3,744	3,744	100.0	3,739	3,744
UK-Anthony Nolan CORD GBCB	807	807	100.0	807	807
UK-BBMR CORD ## BSCB	15,773	15,772	100.0	15,707	15,772
USA-Cedar Knolls CORD CKCB	3,859	3,859	100.0	3,859	3,859
USA-Cleveland CORD CLCB	182	182	100.0	182	182
USA-Gift of Life CORD U4CB	715	715	100.0	715	715
USA-New York CORD NYCB	56,814	56,814	100.0	1,600	48,995
USA-NMDP CORD ## U1CB	132,283	132,283	100.0	127,888	132,226
USA-Paramus NJ CORD PMCB	1,732	1,732	100.0	1,732	1,732
USA-StemCyte CORD ACCB	18,922	18,921	100.0	18,922	18,921

tylko u dzieci. Zwykle nie jest wystarczająca do odtworzenia układu krwiotwórczego u biorców dorosłych. Konieczne jest więc zastosowanie nie tylko wydajnych metod preparowania krwi pępowinowej, ale także takich sposobów krioprezewacji i przechowywania wyizolowanych komórek jądrzastych, aby ich odzysk i potencjał proliferacyjny, jako materiał służący do celów przeszczepienia był jak najwyższej jakości.

Z reguły, komórki krwiotwórcze nie są poddawane preparatyce bezpośrednio po ich pobraniu, które często odbywa się w nocy, a dopiero po kilku godzi-

nach przechowywania w lodówce lub temperaturze pokojowej i przekazaniu ich do wyspecjalizowanego banku krwi pępowinowej. Efektywne bankowanie tego materiału transplantacyjnego wymaga bardzo często redukcji objętości pobranej krwi, nie tylko żeby zmniejszyć przestrzeń i koszty jej przechowywania, ale także po to, żeby zminimalizować objętość toksycznego dla biorcy krioprotektora (dimetylosulfotlenek, DMSO) w tym przeszczepianym materiale. Najczęściej stosowaną metodą preparatyki krwi pępowinowej jest izolacja kożuszka leukocytarnego przy pomocy separatora firmy Optipress oraz sedymentacja w roztworach wielkocząsteczkowych ze skrobią hydroksyetylowaną (HES) lub żelatyną [30, 32]. Zaletą preparatyki z użyciem separatora jest wykonanie operacji w tzw. systemie zamkniętym, co zapewnia maksymalną ochronę przed ewentualnym zakażeniem tego materiału. Natomiast sedymentacja w HES-ie takich warunków nie zapewnia. Ostatnim etapem preparatyki jest zamrożenie wyizolowanych komórek jądrzastych w środowisku DMSO w celu zapobieganiu krystalizacji cząsteczek wody zawartej w komórkach i w konsekwencji ich uszkodzenia. Tak otrzymany preparat umieszcza się w pojemnikach kriochronnych i wraz z kilkoma dołączonymi próbkami archiwizacyjnymi do wykonania niezbędnych badań bez konieczności rozmrażania całości, poddaje się kontrolowanemu komputerowo procesowi mrożenia. Dopiero potem preparat przenoszony jest do zbiornika z ciekłym azotem, gdzie jest przechowywany do momentu zastosowania. Od momentu zamrożenia do wydania do przeszczepienia krew pępowinowa musi być przechowywana w temperaturze kriogenicznej, która jest bez przerwy całodobowo kontrolowana oraz monitorowana komputerowo. W przypadku braku dopływu prądu lub braku odpowiedniej ilości azotu do utrzymania wymaganej temperatury uruchamiany jest system powiadamiania. Klasycznie, temperaturą do przechowywania zamrożonego materiału komórkowego jest temperatura ciekłego azotu (-196°C), która pozwala na wieloletnie przechowywanie takiego materiału i pozostaje bez ujemnego wpływu na aktywność proliferacyjną komórek krwiotwórczych, w tym komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej [28, 29, 36].

W trakcie preparatyki krew pępowinowa poddawana jest ocenie ilościowej i jakościowej. Ocena jakościowa polega na badaniu stanu infekcyjnego, czyli ewentualnego zakażenia jednostki podczas jej preparatyki i wymaga wykonania posiewów bakteriologicznych w kierunku bakterii tlenowych, beztlenowych i grzybów, a także wykonania szeregu badań wirusologicznych oraz oznaczenia antygenów zgodności tkankowej klasy I i II (HLA ABDR) na poziomie niskiej rozdzielczości metodami genetycznymi. Ocena ilościowa natomiast to oznaczenie liczby komórek jądrzastych oraz liczby komórek CD34+. W przypadku bankowania krwi pępowinowej dla celów przeszczepień autologicznych w ramach preparatyki nie jest wykonywane oznaczanie HLA [31].

Stan prawny obowiązujący w 2012 r. Pobraną krew pępowinową, która po poddaniu preparatyce jest następnie zamrażana, przechowuje się na całym już świecie w prywatnych lub państwowych od przeszło 20 lat. Jest to gotowy materiał transplantacyjny. Przeszczepienie odbywa się bezpośrednio po rozmrożeniu materiału przy łóżku chorego. Państwowe banki krwi pępowinowej zbierają wyselekcjonowane pod względem liczby komórek krwiotwórczych i stanu infek-

cyjnego, jednostki krwi pępowinowej do wykorzystania w alogenicznych transplantacjach szpiku. Z reguły, choć nie wyłącznie, państwowe banki tworzą swoje bazy danych o zgromadzonych jednostkach wspólnie z rejestrami niespokrewnionych dawców szpiku. Takie bazy zawierają dane poszczególnych jednostek krwi pępowinowej obejmujące: dane immunogenetyczne, objętość pozyskanej krwi pępowinowej, liczbę zawartych w niej komórek jednojądrowych, wśród których znajdują się krwiotwórcze komórki macierzyste CD34.

W listopadzie 2000 roku na zlecenie Ministerstwa Zdrowia przy Poltransplancie w Warszawie został utworzony Centralny Rejestr Niespokrewnionych Dawców Szpiku i Krwi Pępowinowej (CRNDSiKP). Podstawą prawną w Polsce do zorganizowania i działania banków krwi pępowinowej jest ustawa z dn. 1.07.2005 o pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów (tzw. ustawa transplantacyjna) ze zmianami w niektórych zapisach wprowadzonymi w lipcu 2009 (Dz.U. z 2005 r. Nr 169, poz. 1411 z późn. zm.). Zapisy oparte na ustawodawstwie Unii Europejskiej podyktowane zostały trzema dyrektywami unijnymi: Dyrektywą Komisji 2004/23/WE, Dyrektywą Komisji 2006/17/WE oraz Dyrektywą Komisji 2006/86/WE oraz z uwzględnieniem standardów jakości i poufności opracowanych przez WMDA.

Ustawa transplantacyjna oraz dotyczące rozporządzenia szczegółowe opracowane przez Ministerstwo Zdrowia są zgodne z aktami prawnymi (WE) Nr 1394/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 listopada 2007 r. w sprawie produktów leczniczych terapii zaawansowanej (zmieniającego Dyrektywę 2001/83/WE). Z kolei akt prawny (WE) nr 726/2004 dotyczący produktów inżynierii tkankowej, które znajdują się w legalnym obrocie na rynku Wspólnoty musi obowiązywać najpóźniej do dnia 30 grudnia 2012 r. zgodnie z przepisami krajowymi oraz wspólnotowymi. Konsekwencją wejścia w życie obu tych aktów prawnych jest konieczność uzyskania przez jednostki przygotowujące produkty lecznicze terapii zaawansowanej pozwolenia na 1) prowadzenie działalności jako bank komórek w zakresie dawstwa, pobierania i testowania zgodnie z wymogami ustawy z dnia 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów i przepisów wydanych na podstawie tej ustawy oraz 2) na wytwarzanie produktów leczniczych zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 1 października 2008 r. w sprawie Wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania (Dz.U. Nr 184, poz. 1143, z późn. zm.). Organem administracji państwowej sprawującym nadzór nad bankami tkanek, w tym także nad bankami krwi pępowinowej, jest Krajowe Centrum Bankowania Tkanek i Komórek.

Prywatne banki krwi pępowinowej gromadzą CBU w celu ewentualnego wykorzystania w przypadku konieczności zastosowania leczenia autologicznymi komórkami macierzystymi krwiotwórczymi. Za pobranie i przechowywanie takiej jednostki płacą rodzice dziecka, zachowując w ten sposób pełne prawa do jej własności. Państwowe banki krwi pępowinowej zbierają wyselekcjonowane pod względem liczby komórek krwiotwórczych i stanu infekcyjnego, jednostki krwi pępowinowej do wykorzystania w alogenicznych transplantacjach szpiku [26, 29, 30, 33]. Z reguły, choć nie wyłącznie, państwowe banki tworzą swoje bazy

## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie

danych o zgromadzonych jednostkach wspólnie z rejestrami niespokrewnionych dawców szpiku [34].

W Polsce w 4 państwowych bankach krwi pępowinowej zgromadzono i zamrożono łącznie ponad 719 CBU. Są to:

- Bank Komórek Krwiotwórczych przy Katedrze i Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych WUM, utworzony w 1999 r. dzięki sponsorowi Polsat Dzieciom (pozwolenie z dn. 28.12.2007),
- Bank Krwi Pępowinowej im. J. Carrerasa przy Zakładzie Hematologii Doświadczalnej, Centrum Onkologii - Instytut w Warszawie, utworzony w 1999 r. na zamówienie MZ i Komitetu Badań Naukowych (pozwolenie z dn. 28.12.2007),
- Bank Krwi Łożyskowej przy Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, utworzony w 2000 r. (pozwolenie z dn. 23.04.2008),
- Bank Krwi Pępowinowej Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, utworzony w 2009 r. (pozwolenie z dn. 23.04.2008).

Zgromadzone w nich CBU mogą być do dyspozycji wszystkich potrzebujących - nie na potrzeby autologiczne dla konkretnej osoby - dziecka lub dorosłej. Niewielka liczba zgromadzonych jednostek wynika ze skąpych funduszy, które w latach poprzednich umożliwiły zbankowanie tak małej liczby jednostek. Od 2010 r. w Polsce wygospodarowano, w ramach Narodowego Programu Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej, niewielkie środki finansowe na bankowanie krwi pępowinowej w celu wykorzystania ich do transplantacji alogenicznych.

W polskich 6 bankach komercyjnych przechowywanych jest przeszło 50 tys. CBU. Wydane na taką działalność pozwolenia MZ obowiązują do końca 2012 r. Rodzicom oferuje się możliwość zamrożenia jednostek bezpośrednio po porodzie i usługa ta cieszy się popularnością. Rodzice mogą na własny koszt zdeponować krew pępowinową swojego dziecka - tylko i wyłącznie na jego potrzeby lub swojej rodziny. Pobranie krwi pępowinowej kosztuje 1,5 - 3 tys. zł., a ich przechowywanie wraz z próbkami w celach archiwizacji kosztuje ok. 400 zł. rocznie, a 18-letni depozyt od 3,5 do 4 tys. zł. Lekarze jednak podkreślają, że prawdopodobieństwo zastosowania własnej krwi pępowinowej u dziecka, od którego je pobrano jest bardzo niewielkie. Natomiast opracowania naukowe mówią o prawdopodobieństwie rzędu 1 do 10 tysięcy, a nawet 1 do 100 tysięcy. Na świecie odnotowano dotychczas tylko 17 przypadków wykorzystania krwi pępowinowej na własne potrzeby. We Francji i we Włoszech bankowanie prywatne jest zabronione [31].

We wrześniu 2008 w imieniu Amerykańskiego Towarzystwa Transplantacji Szpiku i Krwi (ASBMT) przeanalizowano aktualnie dostępne dane i opinie, a następnie opublikowano zalecenia dla publicznych i prywatnych banków krwi pępowinowych. Między innymi podkreślono w tym dokumencie, że dawcy krwi pępowinowej stanowić mogą użyteczną alternatywę dla źródła krwiotwórczych komórek macierzystych dla pacjentów bez odpowiednio dobranych i łatwo dostępne spokrewnionych i niespokrewnionych dawców komórek macierzystych. Przyszłych rodziców przekonywano, że dzisiaj może mieć do wyboru albo przekazanie CB do banku publicznego CB lub utrzymanie i przechowywanie CB w prywatnych bankach. Jednak brak jest obecnie wiedzy na temat potencjal-

nego w przyszłości wykorzystania tego materiału w celach autologicznych zabiegów transplantacji. Bowiern prawdopodobieństwo użycia własnego CB jest tak małe i nawet trudne do oszacowania, jak 0,04% (1:2500) do 0,0005% (1:200,000) w ciągu pierwszych 20 lat życia. Dlatego, przechowywania CB do użytku osobistego nie jest zalecane. Zalecano natomiast oddawanie CB w miarę możliwości do zorganizowanych banków publicznych. Zalecane jest również gromadzenie i przechowywanie CB dla członka rodziny, ponieważ istnieje ewentualność wystąpienia choroby u rodzeństwa lub innego członka rodziny, która mogłaby być leczona z powodzeniem alogenicznym przeszczepieniem, ze względu na posiadanie wspólnych wtedy antygenów HLA w rodzinie. Dokument uwzględnia także stale rozszerzające się wskazania do transplantacji CBU w przyszłości.

W naszym kraju wszystkie inicjatywy wynikające z wdrażania nowego systemu organizacyjnego łączącego kooperujące i uzupełniające się w swojej działalności ośrodki ma w założeniu zwiększenie liczby wykonywanych transplantacji.

Krwiotwórcze komórki macierzyste ostatnio określane są jako panaceum XXI wieku. Podstawowym argumentem jest tu fakt, że krew pępowinowa nie jest beзуżyteczna po urodzeniu dziecka i ciągle jest utylizowana. Podczas narodzin dziecka istnieje jedyna szansa na pobranie krwi pępowinowej [30, 31]. Wyizolowane z niej KKM mogą mieć praktyczne zastosowanie w transplantacjach w celu odbudowy układu krwiotwórczego i odpornościowego [26, 37]. A przyszłość rysuje się jeszcze bardziej zachęcająco. Ostatnie odkrycia sugerują ogromny przełom, jakim będzie wykorzystanie tzw. komórki macierzystej mezenchymalnej, z której w warunkach laboratoryjnych wyhodowano już komórki potomne, typowe dla różnych tkanek jak kostna, chrzęstna, mięśniowa, nerwowa bądź podścielisko szpiku [37, 38].

Obecnie prowadzone są badania i pierwsze zastosowania kliniczne nad użyciem tych komórek w procesach regeneracyjnych m.in. w terapii odbudowy blizn pozawałowych, leczeniu choroby Alzheimerera, Parkinsona, udaru mózgu, stwardnienia rozsianego i cukrzycy [39]. Naukowcy nie mają wątpliwości, że wykorzystywanie komórek macierzystych w przyszłości będzie coraz szersze.

## Literatura

- [1] Nowak J., Gronkowska A.: Uwarunkowania poszukiwań i doboru dawców szpiku do transplantacji. *Wiad. Lek.* 2004; 57: 9–10: 477–481
- [2] Martin P.L., Kurtzberg J., Hesse B.: Umbilical cord blood: a guide for primary care physicians. *Am. Fam.Physician*, 2011; 84 (6): 661-666
- [3] Pojda Z., Machaj E.K., Grajkowska A., Ołdak T., Jastrzevska M.: Badania potencjalnej przydatności klinicznej komórek krwiotwórczych uzyskanych z krwi pępowinowej. *Postępy Biologii Komórki*, 2003; tom 30, supl. nr 21, 127-137
- [4] Stec M., Jarocho D., Zembala M.: Optymalizacja metod izolacji i ekspansji komórek CD34+ krwi pępowinowej. *Postępy Biologii Komórki*, 2003; tom 30, supl. nr 21, 103-114
- [5] de Lima M., Fernandez-Vina M., Shpall E.J.: HLA matching of CB: it's complicated. *Blood*, 2011; 118(14): 3761-62

## 2. Banki krwi pępowinowej w Polsce i na świecie

- [6] Wagner J.E., Gluckman E.: Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin. Hematol.*, 2010; 47 (1): 3-12
- [7] Gluckman E., Rocha V.: Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica.*, 2009; 94 (4): 451-54
- [8] Rocha V., Sanz G., Gluckman E.: On behalf of Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Umbilical Cord Blood Transplantation. *Current Opinion in Hematology.* 2004; 11 (6): 375-385
- [9] Devine S.M., Lazarus H.M., Emerson S.G.: Clinical application of hematopoietic progenitor cell expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 31: 241-252
- [10] Avery S., Barker J.N.: Cord blood transplantations: one, two Or more units? *Curr. Opin. He-matol.*, 2010; 17 (6): 531-37
- [11] Milano F, Heimfeld S., Gooley T. i wsp.: Correlation of infused CD3+ CD8+ cells on single-donor dominance after double unit cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2012; abstract.
- [12] Stanevsky A., Shimoni A., Yerushalmi R., Nagler A.: Double umbilical cord blood transplant: more than a cell dose?, *Leuk. Lymphoma*, 2010; 51 (6): 975-982
- [13] Jędrzejczak W.W., Rokicka M., Urbanowska E. i wsp.: Simultaneous transplantation of two allogeneic unit of cord blood in an adult patient with acute myelo-blastic leukemia. A case report, *Archivum Immunol. Ther. Exp.*, 2005; 53: 364-368
- [14] Somers J. A., Brand A., van der Holt B. i wsp.: Double umbilical cord blood transplantation preceded by a reduced-intensity conditioning regiment: rapid induction of single donor chimerism and highly predictive value of early CD4+ T cell and NK cell predominance. Abstract nr 3026, *Book of abstract American Society of Hematology*, Los Angeles, USA, XI 2012
- [15] Gertow J., Berglund S., Okas M. i wsp.: Characterization of long-term mixed donor-donor chimerism after double cord blood transplantation. *Clin Exp Immunol.* 2010; 162 (1): 146-155
- [16] Gutman J.A., Riddell S.R., McGoldrick S., Delaney C.: Double unit cord blood transplantation: Who wins-and why do we care? *Chimerism.* 2010; 1 (1): 21-22
- [17] Erices A., Conget P., Hinguell J.J.: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*, 2000; 109: 235-242
- [18] Eapen M., Rocha V., Sanz G. i wsp.: Effect of graft source on unrelated donor hematopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010, 11 (7): 653-660.
- [19] Gratwohl A., Baldomero H., Frauendorfer K., Rocha V., Apperley J., Niederwieser D. The EMBT activity survey 2006 on haematopoietic stem cells transplantation: Focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 687-705
- [20] Passweg J.R., Baldomero H., Gratwohl A. i wsp.: European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47 (7): 906-923
- [21] Grewal S.S., Barker J.N., Davies S.M., Wagner J.E.: Unrelated donor hematopoietic cell trans-plantation: marrow or umbilical cord blood. *Blood*, 2003; 101: 4233-44
- [22] Spellman S.R., Eapen M., Logan B.R. i wsp.: A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood.* 2012 June; pre-published online.

## 2.7. Badania i preparatyka w celach transplantacyjnych bankowanej CBU

- [23] Gluckman E., Boudjedir K., Cunha R. i wsp.: Milestones in umbilical cord blood transplantation. *British journal of haematology*, 2011; 154 (4): 441-447
- [24] Ilnicki K., Urbanowska E.: Wpływ temperatury długotrwałego przechowywania komórek jądrowych krwi pępowinowej na ich przeżycie i potencjał proliferacyjny. *Acta Haematologica Polonica*, 2009; 40 (3): 705-715
- [25] Querol S., Rubinstein P., Marsh S.G. i wsp.: Cord blood banking: 'providing cord blood banking for a nation'. *Br J Haematol.* 2009; 147 (2):227-35
- [26] Brunstein C.G., Setubal D.C., Wagner J.E.: Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 2007; 137 (1): 20-35
- [27] The 2008 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Editors: Apperley J. Carreras E., Gluckman E., Gratwohl A., Masszi T., The 5th edition, Chapter 5: 112-127
- [28] Rocha V., Broxmeyer H.E.: New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: S126-S132
- [29] Katz G., Mills A., Garcia J. i wsp.: Banking cord blood stem cells: attitude and knowledge of pregnant women in five European countries. *Transfusion.* 2011; 51(3): 578-86
- [30] Ballen K., Barker J.N., Stewart S.K., Greene M.F, Lane T.A.: Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 356-63
- [31] Gluckman E., Kurtzberg J., Navarrete C. i wsp.: Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica* 2011; 96 (11): 1700-7
- [32] Machaj E.K., Ołdak T., Gajkowska A. i wsp.: Pozyskiwanie, preparatyka i zamrażanie krwi pępowinowej dla celów klinicznych. *Acta Haematologica Polonica*, 2001; 32 (3): 317-323
- [33] Sun J., Allison J., McLaughlin C. i wsp.: Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: a pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion.* 2010; 50 (9):1980-87
- [34] Barker J.N., Byam C., Scaradavou A.: How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood*, 2011; 24: 117 (8): 2332-39
- [35] Ruggeri A., Peffault de Latour R., Rocha V. i wsp.: Double cord blood transplantation in patients with high risk bone marrow failure syndromes. *British Journal of Haematology* 2008; 143 (3):4048
- [36] Broxmeyer H.E., Lee M.R., Hangoc G. i wsp.: Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. *Blood.* 2011; 117 (18): 4773-7
- [37] Cohen Y, Nagler A.: Umbilical cord blood transplantation—how, when and for whom? *Blood Rev.* 2004; 18 (3): 167-179
- [38] Le Blanc K., Ringdén O.: Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11 (5): 321-334
- [39] Martin P.L., Kurtzberg J., Hesse B.: Umbilical cord blood: a guide for primary care physicians. *Am Fam Physician.* 2011; 15: 84 (6): 661-666

Dodatkowe/uzupełniające piśmiennictwo u autorek



# TYPOWANIE NIEKLASYCZNYCH ANTYGENÓW ZGODNOŚCI TKANKOWEJ – ZNACZENIE W DOBORZE PARY DAWCA BIORCA ALOGENICZNEGO PRZESZCZEPIENIA KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH

Milena Iwaszko, Katarzyna Gębura, Katarzyna Bogunia-Kubik

*Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu*

## Streszczenie

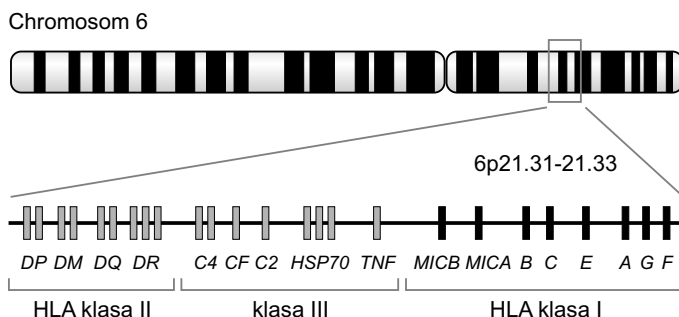
Wyniki najnowszych badań dokumentują udział nieklasycznych cząsteczek antygenów zgodności tkankowej w odpowiedzi immunologicznej i ich kliniczne znaczenie również u pacjentów poddanych alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. W niniejszej pracy przedstawiono podstawowe informacje dotyczące funkcji nieklasycznych cząsteczek HLA klasy Ib oraz omówiono dotychczasowe doniesienia na temat związku polimorfizmów genów kodujących te białka z powodzeniem alogenicznego przeszczepienia.

*Słowa kluczowe:* HLA-E, HLA-G, MICA/B, NKG2, HSCT

### 3.1. Wstęp

Dobór pary dawca-biorca alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych oparty jest na potwierdzeniu genetycznej zgodności dawcy i biorcy w allelach genów kodujących cząsteczki antygenów zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigens*, HLA). Oznaczane są specyficzności klasycznych *loci* HLA klasy I - A, B, C (określane mianem klasy Ia) oraz HLA klasy II - DRB1 i DQB1. Spośród cząsteczek HLA klasy I można ponadto wyróżnić HLA-E, -F, -G oraz MICA i MICB (ang. *MHC class I chain-related molecule A/B*), należące do nieklasycznych HLA klasy Ib. Wśród nieklasycznych HLA klasy II wyróżnia się HLA-DM i HLA-DO. Geny kodujące zarówno klasyczne jak i nieklasyczne cząsteczki HLA znajdują się na chromosomie 6 (Rycina 3.1). Obok cząsteczek HLA na krótszym ramieniu 6 chromosomu kodowane są również inne białka, m.in.

czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) czy białko szoku termicznego (ang. *heat shock protein 70*, HSP-70), a polimorfizm kodujących je genów należy do czynników związanych z powodzeniem alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych [1, 2]. O ile znaczenie typowania klasycznych *loci* HLA w transplantacji komórek hematopoetycznych jest dobrze udokumentowane, rola nieklasycznych cząsteczek HLA jest znacznie mniej poznana. W niniejszej pracy przedstawione zostaną podstawowe informacje dotyczące funkcji nieklasycznych cząsteczek HLA klasy Ib oraz omówione dotychczasowe doniesienia na temat związku typowania HLA-E, HLA-G oraz MICA z powodzeniem alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych.



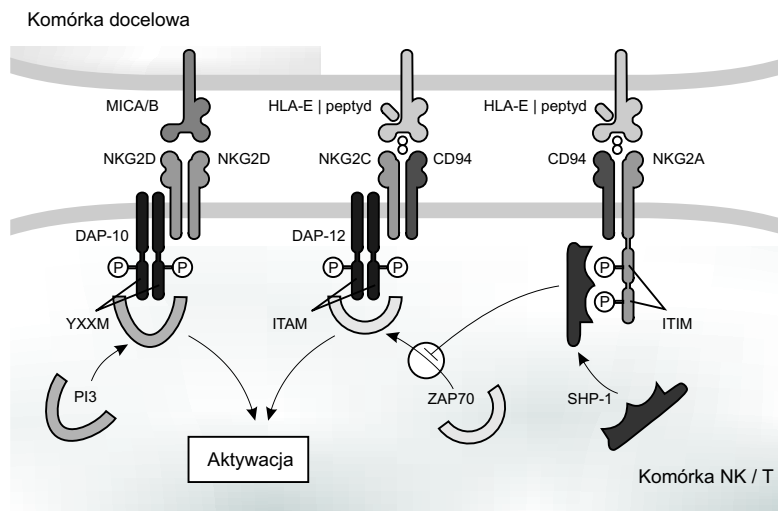
Rycina 3.1: Schemat organizacji genów w regionie kodującym HLA.

### 3.2. HLA-E

HLA-E jest najlepiej poznanym antygenem MHC klasy Ib i najmniej polimorficzną cząsteczką ze wszystkich molekuł MHC klasy I. W ludzkiej populacji opisano zaledwie dziesięć alleli, które kodują trzy różne białka. Tylko dwa z tych alleli *HLA-E\*01:01* oraz *HLA-E\*01:03* występują w populacji z dużą częstością (około 50% każdy z nich). Białka kodowane przez te allele różnią się między sobą jednym aminokwasem w pozycji 107 w domenie  $\alpha 2$  łańcucha ciężkiego HLA-E. W białku kodowanym przez allel *HLA-E\*01:01* jest to arginina, a w kodowanym przez allel *HLA-E\*01:03* glicyna. Wariant *HLA-E\*01:03* ulega ekspresji powierzchniowej znacznie bardziej efektywnie niż *HLA-E\*01:01* oraz wykazuje większe powinowactwo do peptydów liderowych i odznacza się lepszą stabilnością termiczną.

W standardowych warunkach fizjologicznych HLA-E łączy się przede wszystkim z peptydami pochodzącymi z reszt aminokwasowych sekwencji sygnałowych większości molekuł HLA klasy Ia, których związanie umożliwia ekspresję powierzchniową HLA-E. Białko HLA-E jest ligandem receptorów CD94/NKG2 występujących głównie na komórkach NK, a także na limfocytach CD8<sup>+</sup> T i w związku z tym odgrywa istotną rolę w regulacji cytotoksycznej odpowiedzi komórek immunologicznych (Rycina 3.2). Główną funkcją HLA-E jest prezentowanie peptydów liderowych za pośrednictwem hamującego receptora CD94/NKG2A komórkom NK. Na prawidłowo działającej komórce receptor ten

### 3. Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej ...



Rycina 3.2: Schemat interakcji między cząsteczkami HLA-E i MICA/B i ich receptorami NKG2.

Przekazywanie sygnału aktywującego i hamującego reguluje aktywność komórek NK i CTL. Interakcja między aktywującym receptorem CD94/NKG2C i prezentującą peptyd cząsteczką HLA-E prowadzi do wiązania białka DAP-12 zawierającego motywy aktywacji receptora tyrozyny (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ITAM), które z kolei oddziałują z białkiem ZAP70, inicjując kaskadę przekazywania sygnału prowadzącą do aktywacji komórek NK i CTL. W wyniku oddziaływania receptora hamującego CD94/NKG2A z prezentującą peptyd cząsteczką HLA-E dochodzi do fosforylacji motywów hamujących (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, ITIM) receptora NKG2A, prowadzącej do przyłączenia białka SHP-1. Powoduje to defosforylację białka ZAP70, uniemożliwiającą jego wiązanie się z regionami ITIM i w efekcie zahamowanie szlaku aktywacji. Interakcja aktywującego receptora NKG2D z cząsteczką MICA/B prowadzi do wiązania (zawierającego fragmenty YXXM) białka DAP-10, które współdziała z kinazą PI3 w przesyłaniu sygnału aktywującego.

rozpoznaje prezentowane przez HLA-E peptydy liderowe i przekazuje sygnał blokujący aktywację komórek NK, co zapobiega destrukcji komórek docelowych. Dzięki temu mechanizmowi komórki NK monitorują zarówno syntezę molekuł MHC klasy Ia, jak i zdolność komórek do prezentowania antygenów. Przy niewielkiej liczbie dostępnych peptydów liderowych (np. w przypadku infekcji lub transformacji nowotworowej) nie dochodzi do ekspresji białek HLA-E na powierzchni komórki, w związku z czym komórki NK nie otrzymują sygnału hamującego za pośrednictwem receptora CD94/NKG2A, co powoduje ich aktywację i lizę komórek docelowych. Wykazano również, że aktywujący receptor CD94/NKG2C może oddziaływać z białkiem HLA-E, jednakże wykazuje on kilkukrotnie mniejsze powinowactwo do tego białka niż receptor CD94/NKG2A. Funkcjonalne znaczenie tej interakcji nie zostało dotychczas do końca wyjaśnione.

Kompleksy HLA-E - peptyd mogą być również rozpoznawane przez subpopulację limfocytów T CD8+, zwanych NK-CTL (ang. *NK-cytotoxic T lymphocyte*) za pośrednictwem receptorów TCR (ang. *T-cell receptor*). NK-CTL reprezentują frakcję limfocytów T CD8+ CD28- z fenotypem typowym dla komórek pamięci, charakteryzującą się koekspresją receptorów TCR V $\beta$  oraz hamujących receptorów swoistych dla komórek NK (ang. *inhibitory NK receptors*, iNKR). Cząsteczka HLA-E, oprócz standardowych peptydów liderowych, może również wiązać niektóre peptydy bakteryjne oraz wirusowe, jak również peptydy pochodzące z sekwencji sygnałowych molekuł HLA-G, białek szoku termicznego Hsp60, a także białek związanych z opornością wielolekową (ang. *multidrug resistance-associated protein*, MRP7). Limfocyty NK-CTL są zdolne do identyfikowania prezentowanych przez białko HLA-E peptydów bakteryjnych oraz wirusowych i generowania odpowiedzi cytotoksycznej przeciwko takim komórkom, co może stanowić dodatkowy mechanizm obrony gospodarza przeciwko infekcjom bakteryjnym i wirusowym.

Na potencjalną rolę molekuł HLA-E w odpowiedzi immunologicznej na przeszczep alogeniczny wskazują wyniki eksperymentów z użyciem modeli mysich transfekowanych ludzkimi sekwencjami kodującymi badane białko. Romagnani i wsp. [3] zaobserwowali, że w subpopulacji CD8+ limfocytów T istnieją takie, które rozpoznają peptydy prezentowane na komórkach docelowych przez białka HLA-E. W odpowiedzi na stymulację peptydami alogenicznymi limfocyty te są zdolne do szybkiej proliferacji i w jej następstwie do lizy takich alogenicznych komórek. Co więcej eksperymenty transplantacyjne z transgenicznymi myszami, którym transfekowano ludzki gen HLA-E pokazały, że białko to jest odpowiedzialne za odrzucenie przeszczepu w stopniu podobnym do klasycznych antygenów HLA klasy I [4].

W dotychczasowych badaniach nad wpływem polimorfizmu HLA-E na wynik alogenicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych u ludzi zaobserwowano, że genotyp *HLA-E\*01:03* u biorcy jest związany z obniżonym ryzykiem wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft versus host disease*, GvHD) oraz obniżoną śmiertelnością związaną z przeszczepem (ang. *transplant related mortality*, TRM) [5–10]. Wyniki te sugerują, że allel *HLA-E\*01:03* w układzie homozygotycznym działa jako czynnik ochronny przed komplikacjami poprzyszczepowymi przyczyniając się do wydłużenia przeżycia pacjentów. Wykazano również, że niezgodność między dawcą a biorcą pod względem allelu HLA-E związana jest ze wzrostem ryzyka wystąpienia GvHD [10].

Zaproponowano dwie hipotezy dotyczące wpływu polimorfizmu HLA-E na występowanie powikłań po przeszczepie. Jedna z nich opiera się na założeniu, że przeżycie pacjentów zależy może od różnic między allelami wpływającymi na ich oddziaływanie z receptorami komórek NK. Niedojrzałe komórki NK po przeszczepie charakteryzują się wysoką ekspresją receptorów CD94/NKG2A oraz podwyższoną sekrecją cytokin, głównie IFN- $\gamma$  [11]. Cytokiny te pobudzają okoliczne komórki m.in. do ekspresji białek HLA-E, co w połączeniu ze wspomnianą obecnością receptorów hamujących na dojrzewających komórkach NK jest ważnym mechanizmem zapobiegającym incydentom autoimmunologicznym.

### 3. Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej...

nym, które mogłyby być spowodowane przez niekompletnie wykształcone komórki NK. W ten sposób komórki zawierające allel HLA-E\*01:03, odznaczający się wyższą ekspresją powierzchniową, skuteczniej hamują poprzez interakcję z receptorem CD94/NKG2A aktywność dojrzewających komórek NK pochodzących z komórek hematopoetycznych dawcy, chroniąc w ten sposób komórki biorcy przed uszkodzeniami cytotoksycznymi w środowisku poprzyszczepowym. Z kolei białko kodowane przez allel HLA-E\*01:01 charakteryzujący się znacznie niższą ekspresją powierzchniową molekuł HLA-E nie zapewnia dostatecznej ochrony przed atakiem komórek NK.

Z drugiej strony Nguyen i wsp. [11] zaobserwowali, że niekompletnie wykształcone komórki NK po przeszczepie, charakteryzujące się wysokim poziomem receptorów CD94/NKG2A, nie są zdolne do efektywnego niszczenia komórek nowotworowych. Interferon wydzielany przez niedojrzałe komórki NK powoduje podwyższenie ekspresji cząsteczek HLA-E na powierzchni komórek nowotworowych, co prowadzi do przesyłania sygnału hamującego do komórek NK, za pośrednictwem występujących na nich w dużych ilościach receptorów NKG2A. Interakcja ta hamuje aktywność cytotoksyczną komórek NK skierowaną przeciwko komórkom białaczkowym, prowadząc do osłabienia pożądanego dla pacjenta efektu przeszczep przeciwko białaczce (ang. *graft versus leukemia*, GvL). Z powyższych danych wynika, że szlak sygnałowy HLA-E -CD94/NKG2A może zapobiegać zarówno incydom autoimmunologicznym, chroniąc prawidłowe komórki organizmu przed zniszczeniem, jak również może uniemożliwiać efektywne niszczenie komórek nowotworowych.

Kolejna hipoteza zakłada, że różnice w przeżyciu między nosicielami różnych alleli mogą wynikać także z ich zróżnicowanego wpływu na interakcje komórek z receptorami limfocytów T. Choroba GvH po przeszczepie tkanek od niezgodnego dawcy spowodowana jest aktywacją limfocytów T wykrywających różnice w głównych antygenach zgodności tkankowej. W przypadku przeszczepu od dawcy zgodnego pod względem głównych *loci* HLA limfocyty T dawcy mają zdolność rozpoznawania mniejszych antygenów zgodności tkankowej (ang. *minor histocompatibility antigens*, mHAG) biorcy, co w razie ich aktywacji po wykryciu niezgodności może prowadzić do reakcji GvHD. Cząsteczki mHAG prezentowane są głównie przez HLA klasy Ia. Istnieje możliwość, że molekula kodowana przez *HLA-E\*01:03* jest zdolna do wiązania cząsteczek mHAG, jednakże ich prezentacja limfocytom T przebiega nieefektywnie i nie powoduje ich aktywacji. Według tej hipotezy molekula kodowana przez *HLA-E\*01:03* współzawodniczy z cząsteczkami HLA klasy Ia o wiązanie molekuł mHAG, obniżając efektywność ich prezentacji limfocytom T, a co za tym idzie ryzyko wystąpienia GvHD [5].

W przypadku przeszczepów od niespokrewnionego dawcy zaobserwowano również związek między allelem *HLA-E\*01:01* dawcy a rozwojem infekcji bakteryjnych oraz przeżyciem pacjentów po transplantacji [12]. Wskazuje to, że allel ten jest czynnikiem predysponującym do rozwoju infekcji poprzyszczepowych. Podobne wyniki uzyskano w przypadku anemii sierpowatej, gdzie genotyp *01:01,01:01* związany był ze zwiększoną częstością występowania infekcji bakteryjnych [13]. Zakłada się możliwość, że podczas infekcji obecność nieefektyw-

nie prezentującego peptydy wariantu kodowanego przez *HLA-E\*01:01* w układzie homozygotycznym wpływa negatywnie na prezentację peptydów bakteryjnych przez HLA-E, czego konsekwencją jest brak aktywacji limfocytów T zdolnych do niszczenia zainfekowanych komórek.

Dotychczasowe doniesienia wskazują również na potencjalną rolę polimorfizmu receptorów z rodziny CD94/NKG2 na wynik alogenicznego przeszczepienia komórek hematopoetycznych. Receptory te należą do lektyn typu C i rozpoznają nieklasyczne cząsteczki MHC klasy Ib. Zbudowane są z podjednostki CD94 połączonej mostkiem disiarczkowym z różnymi białkami z rodziny NKG2 i w zależności od izoformy cząsteczki NKG2 przekazują sygnał hamujący (NKG2A) lub aktywujący (NKG2C) komórkę NK. Białko HLA-E pełni funkcję liganda dla tych receptorów. Do rodziny NKG2 należy również receptor NKG2D. Nie łączy się on jednak z podjednostką CD94 i w postaci homodimeru pośredniczy w aktywowaniu komórek NK. Ligandami dla receptora NKG2D są również nieklasyczne cząsteczki należące do klasy Ib: MICA/B oraz ULBP.

Wstępne wyniki badań nad polimorfizmem receptora CD94/NKG2A sugerują, że może wykazywać on istotne znaczenie dla powodzenia alogenicznego przeszczepienia. Zaobserwowano, że u pacjentów będących homozygotami CC w genie *NKG2A* (rs1983526 C>G) znacznie częściej dochodziło do infekcji wirusem *Herpes* w porównaniu do pacjentów charakteryzujących się genotypem GG. Ponadto genotyp CG u dawcy szpiku związany był z krótszym czasem przeżycia pacjentów w porównaniu do tych, którzy otrzymali przeszczep od dawców z genotypem CC. Podobnie polimorfizm genu kodującego CD94 (rs2302489 A>T) dawcy przeszczepu okazał się wpływać na ryzyko GvHD u pacjentów. Objawy ostrej postaci GvHD obserwowano częściej u pacjentów, którzy otrzymali przeszczep od dawcy z homozygotycznym genotypem AA [14].

W przypadku genu *NKG2D* Espinoza i wsp. [15] zaobserwowali, że obecność haplotypu HNK1 w genie *NKG2D* (rs1049174, HNK1>LNK1) u dawców przeszczepu związana była z lepszym przeżyciem pacjentów oraz obniżoną śmiertelnością związaną z przeszczepem (TRM). Haplotyp HNK1 w genie *NKG2D* związany jest ze zwiększoną aktywnością cytotoksyczną komórek NK, być może więc obecność tego polimorfizmu pełni rolę ochronną przed infekcjami bakteryjnymi, co przekłada się na lepsze przeżycie pacjentów po przeszczepie.

### 3.3. HLA-G

Do rodziny nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej klasy Ib należy także HLA-G. Jego łańcuch białkowy na drodze alternatywnego składania (ang. *splicing*) przybiera postać jednej z 4 izoform związanych z błoną komórkową (G1, G2, G3 oraz G4), bądź też izoform rozpuszczalnych (G5, G6 czy G7 HLA-G chroni komórkę przed zniszczeniem przez układ odpornościowy poprzez wiązanie receptorów ILT2 (LILRB1/LIR1/CD85j), ILT4 (LILRB2/LIR2/CD85d) oraz KIR2DL4 obecnych w szczególności na monocytach, komórkach NK oraz limfocytach T i B. O ile ILT2 i ILT4 należą do receptorów hamujących, KIR2DL4 wydaje się przekazywać zarówno sygnały hamujące, jak i aktywujące.

### 3. Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej ...

Cząsteczka HLA-G moduluje działanie układu immunologicznego poprzez hamowanie aktywności komórek NK, hamowanie dojrzewania limfocytów T CD4+, indukowanie apoptozy aktywowanych komórek CTL CD8+ oraz pobudzenie dojrzewania regulatorowych limfocytów T. Dzięki tym właściwościom HLA-G przyczynia się do obniżenia reaktywności immunologicznej, co wpływa na wzrost tolerancyjności układu odpornościowego. Ekspresja HLA-G podlega ścisłej regulacji i jest ograniczona do niewielu tkanek. Szczególnie wysoką odnotowano w komórkach znajdujących się na powierzchni pozakosmkowej trofoblastu, gdzie odpowiada za tolerancję układu odpornościowego matki wobec obcego antygenowo płodu. Uprzywilejowana ekspresja HLA-G w tkankach płodowych wskazuje na istotną rolę tego antygeny w rozwoju zarodkowym oraz w regulacji odpowiedzi immunologicznej matki na płód. Polimorfizmy w rejonie promotorowym tego genu, jak choćby obecność reszty G w pozycji -725, są czynnikami zwiększonego ryzyka powtarzających się poronień. W warunkach fizjologicznych białko HLA-G ulega ekspresji również na monocytach CD14+ w krwi obwodowej, w komórkach nabłonka grasicy oraz w komórkach Langerhansa trzustki. Z kolei w warunkach patologicznych ekspresja HLA-G towarzyszy niektórym chorobom o podłożu autoimmunologicznym, infekcjom wirusowym, chorobom nowotworowym oraz obserwowana jest w środowisku przeszczepowym.

Potencjalna rola, jaką HLA-G pełni w procesach zachodzących po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych dotychczas nie została do końca wyjaśniona. Gen kodujący powyższą molekułę zawiera stosunkowo niewiele miejsc polimorficznych w porównaniu do pozostałych cząsteczek HLA klasy I, jednak ich wpływ na powodzenie transplantacji wydaje się być bardziej złożony niż początkowo sądzono. Jeden z polimorfizmów genu HLA-G, cieszący się największym zainteresowaniem badaczy, obejmuje delecję (*del*) lub insercję (*ins*) 14 par zasad (bp) w pozycji +2961 na 3' końcu regionu nieulegającego translacji (ang. 3' *untranslated region*, 3'UTR) łańcucha DNA. Powyższa insercja prowadzi do powstania dodatkowego miejsca *splicingu*, co przekłada się na skrócenie eksonu 8 o 92 pary zasad. Powoduje to powstanie bardziej stabilnego mRNA, jednakże mutacja ta jednocześnie obniża poziom ekspresji mRNA, w związku z czym insercja 14 bp w regionie 3'UTR jest odpowiedzialna za obniżoną ekspresję powierzchniową białka HLA-G. Zjawisko to, nazywane „paradoksem polimorfizmu 14-bp”, nie zostało do tej pory ostatecznie wyjaśnione choć podejrzewa się, iż ma tu miejsce równoległe oddziaływanie wielu niezależnych czynników.

Dotychczasowe wyniki dotyczące typowania delecji w genie HLA-G w kontekście HSCT są niejednoznaczne. Boukouaci i wsp. [16] zaobserwowali, że allel *14-bp ins* związany był ze zwiększonym ryzykiem choroby GvH u pacjentów poddanych HSCT. Biorąc pod uwagę, że białko HLA-G wpływa na wzrost tolerancyjności układu immunologicznego, to obniżona ekspresja powierzchniowa tego białka, towarzysząca genotypowi *HLA-G 14-bp ins/ins*, może prowadzić do podwyższenia reaktywności immunologicznej, wynikającej z niewystarczającego hamowania aktywności komórek NK oraz T i w konsekwencji do rozwoju choroby GvH. Hipotezę tą wspierają wyniki badań nad znaczeniem poziomu ekspresji białka HLA-G dla wyniku przeszczepów narządowych, w których zaobserwowano, że

podwyższona ekspresja tego białka związana jest z mniejszym ryzykiem odrzucenia przeszczepu [17]. Wyniki Boukouaci i wsp. wpisują się również w trend wskazujący na niekorzystny wpływ genotypu *HLA-G 14-bp ins/ins* na wynik przeszczepu przy transplantacjach narządów litych [18–20]. Również wyniki uzyskane przez Chiusolo i wsp. [21] sugerują negatywną rolę allelu *14-bp ins* w warunkowaniu odpowiedzi immunologicznej na przeszczep HSC. Zaobserwowali oni, że allel ten związany był z niższym prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów i większym prawdopodobieństwem wystąpienia nawrotu choroby. Podobnie nasza grupa badawcza stwierdziła korzystny wpływ genotypu *HLA-G 14-bp del/del* na przebieg przeszczepienia [10]. Z drugiej strony wyniki opublikowane przez La Nasa i wsp. [22] stoją w sprzeczności z powyższymi doniesieniami. Zaobserwowali oni, że homozygotyczny genotyp *14-bp del/del* u pacjentów poddanych przeszczepowi komórek hematopoetycznych korelował ze zwiększonym ryzykiem choroby GvH. Należy jednak zauważyć, że w tym wypadku badano relatywnie nieliczną grupę pacjentów cierpiących na talasemię beta, podczas gdy wcześniej wspomniane badania skupiały się na pacjentach poddanych przeszczepowi z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że w mechanizm regulacji ekspresji HLA-G, oprócz wspomnianego wariantu genu, zaangażowane są prawdopodobnie także inne czynniki. Do najczęściej wymienianych należy wiązanie mikroRNA do regionu 3' mRNA HLA-G i promujący to zjawisko polimorfizm C>G w pozycji +3142 3'UTR (rs1063320), skutkujący spadkiem ekspresji takiego mRNA. Z kolei obecność reszty A w pozycji +3187 (rs9380142) związana jest ze zmniejszeniem stabilności mRNA HLA-G. Dlatego też przeprowadzenie badań, uwzględniających wszystkie wspomniane czynniki, mogłoby rzucić nowe światło na to zagadnienie i przyczynić się do ostatecznego wyjaśnienia złożonych procesów, składających się na kontrolę ekspresji tego antygeny i jego znaczenia dla wyniku przeszczepienia. Warto zauważyć, iż jak udokumentowano, wysoki poziom ekspresji HLA-G ma korzystny wpływ na przykład na przyjęcie się przeszczepu organów i przeżycie pacjentów.

### 3.4. MICA i MICB

Indukowane stresem białka A i B podobne do antygenów zgodności tkankowej klasy I – MICA i MICB - pozwalają na niezależną od cząsteczek MHC klasy I aktywację komórek NK. Pełnią ponadto funkcję kostymulatorów efektorowych komórek T. MICA i -B nie są na ogół ekspresjonowane w zdrowych komórkach, jednak ich produkcja może być indukowana w odpowiedzi na sytuację stresową. Proces ten wspomagają elementy promotorów szoku cieplnego obecne w genach obu białek. Stwierdzono ponadto, iż MICA i -B ulegają ekspresji niezależnie od siebie. Receptorem dla obu tych molekuł jest NKG2D (Rycina 3.2), obecny na komórkach NK, CD8+  $\alpha\beta$ + T oraz  $\gamma\delta$ + T. Mimo znacznego podobieństwa między MICA i -B (83% sekwencji homologicznych), stopień ich homologii względem cząsteczek MHC klasy I jest niski (15-35%).

Geny białek z rodziny MIC są wysoce polimorficzne. Struktura kodowanych przez nie białek zasadniczo przypomina tę obserwowaną dla łańcucha  $\alpha$  MHC



### 3. Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej ...

klasy I, cząsteczki te nie asocjują jednak z  $\beta 2$ -mikroglobuliną, jak również nie posiadają miejsca wiązania antygenów CD8. Mechanizmy zaangażowane w ekspresję obu białek wciąż pozostają niejasne. Podejrzewa się, że w powyższy proces zaangażowane są kinazy ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (ang. *ATM- and Rad3- related*). Enzymy te są kluczowe dla regulacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B, aktywowanego podczas indukcji stresu i wpływającego na ekspresję MICA i MICB w komórkach T.

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na istotną rolę tych molekuł w rozwoju wielu typów nowotworów i chorób autoimmunologicznych. Uważa się, że nadekspresja powyższych białek, w połączeniu z innymi czynnikami, powoduje NK-zależną śmierć komórek nowotworowych i znacznie zwiększa prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów.

Badania nad polimorfizmem mikrosatelitarnym genu *MICA* nie wykazały istotnych zależności między zgodnością dawcy i biorcy przeszczepienia w allelach *MICA* a przeżyciem pacjentów po transplantacji, rozwojem GvHD czy nawrotem choroby podstawowej [23].

Istotny wpływ na los pacjenta po przeszczepieniu obserwowano natomiast dla polimorfizmu *MICA-129* (mutacja niesynonimiczna; *Met129Val*). Ze względu na obecność metioniny lub waliny w pozycji 129 łańcucha peptydowego, wiązanie cząsteczki MICA do receptora NKG2D jest odpowiednio silne lub słabe. Zaobserwowano związek między obecnością wariantu *MICA-129 Val* a rozwojem przewlekłej postaci choroby GvH [24]. Stwierdzono także, iż efekt ten pogłębia się u pacjentów będących homozygotami *MICA-129 Val/Val*, co sugeruje recesywny charakter powyższego zjawiska. Zakłada się możliwość, że obecność białka MICA-129 Val o niskim powinowactwie do receptora NKG2D skutkuje nadekspresją tego receptora, umożliwiając przyłączanie się do niego alternatywnych ligandów, np. UL16. Interakcje receptora NKG2D z innymi ligandami w środowisku bogatym w IL-15 być może prowadzą do nadmiernej stymulacji komórek NK oraz T i w jej następstwie do destabilizacji systemu kontroli immunologicznej, przejawiającej się incydentami autoreaktywnymi. Boukouaci i wsp. [24] zaobserwowali również związek pomiędzy silnie wiążącym się do receptora NKG2D wariantem białka MICA-129 Met a podwyższonym ryzykiem nawrotu choroby. Uzyskane wyniki sugerują, że genotyp *MICA-129 Met/Met* odpowiadający za aktywację komórek NK, przyczynia się do zmniejszenia zarówno efektu GvH, jak i GvL. Wyniki te są zgodne z powszechnie obserwowaną zależnością, że korzystnemu dla pacjenta obniżeniu ryzyka choroby GvH towarzyszy zmniejszenie pożądanego efektu GvL. Alternatywna hipoteza wyjaśniająca powyższe zależności opiera się na badaniach nad wpływem aloreaktywnych komórek NK na wynik HSCT, w których zaobserwowano, że komórki NK obniżają ryzyko wystąpienia choroby GvH i jednocześnie zwiększają korzystny dla pacjenta efekt GvL [25]. Boukouaci i wsp. wykazali, że genotyp *Met/Met* białka MICA, odpowiadający za aktywację komórek NK, pełni rolę ochronną przed GvHD, jednakże występowanie tego allelu nie tylko nie przyczyniało się do zwiększenia częstości wystąpienia efektu GvL ale korelowało z podwyższonym ryzykiem nawrotu choroby [24].

Tabela 3.1: Związki polimorfizmów nieklasycznych cząsteczek HLA-E, HLA-G, MICA/B z wynikiem alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych.

Allel / genotyp	Efekt	Referencje
<i>HLA-E*01:03, 01:03</i> u dawcy i biorcy	Zmniejszone prawdopodobieństwo aGvHD	[5]
	Zmniejszone prawdopodobieństwo śmiertelności związanej z przeszczepem (TRM)	[5]
<i>HLA-E*01:03,01:03</i> u biorcy	Wyższe prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia	[6, 8, 9]
	Wyższe prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od choroby	[6]
	Zmniejszone prawdopodobieństwo śmiertelności związanej z przeszczepem (TRM)	[6]
	Zmniejszone prawdopodobieństwo aGvHD	[9]
<i>HLA-E*01:03, 01:03</i> u dawcy	Zmniejszone prawdopodobieństwo aGvHD	[7]
	Wyższe ryzyko zgonu związanego z transplantacją (TRM)	[7]
	Wyższe prawdopodobieństwo nawrotu choroby	[7]
<i>HLA-E*01:01, 01:01</i> u dawcy	Większa częstość infekcji bakteryjnych	[13]
	Wyższe ryzyko zgonu związanego z transplantacją (TRM)	[13]
Niezgodność w allelach <i>HLA-E</i> pomiędzy dawcą a biorcą	Zwiększone prawdopodobieństwo aGvHD	[8, 10]
<i>HLA-G 14-bp del/del</i> (w pozycji +2961 3'UTR)	Zwiększone ryzyko aGvHD	[22]
<i>HLA-G 14-bp del/del</i> u dawcy	Wyższe prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia	[10]
<i>HLA-G 14-bp ins/ins</i>	Zwiększone ryzyko aGvHD	[16]
	Niższe prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia	[21]
<i>MICA-129 Val/Val</i>	Zwiększone ryzyko cGvHD	[24]
<i>MICA-129 Met/Met</i>	Ryzyko nawrotu choroby podstawowej	
Brak zgodności w eksonie 2, 3, 4 i 5 genu <i>MICA</i>	Zwiększone ryzyko aGvHD	[26]
Brak zgodności względem <i>MICA</i> i <i>MICB</i>	Niższe prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia	[27]

Co do innych polimorfizmów genu *MICA* udokumentowano, iż brak doboru dawcy i biorcy przeszczepienia względem polimorfizmów w eksonie 2, 3, 4 i 5 *MICA* związany jest z wyższym ryzykiem aGvHD [26] lub obniżonym prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów po przeszczepie [27] (Tabela 3.1). W tym

ostatnim przypadku obserwowano również wpływ braku doboru w zakresie specyficzności MICB, ale miał on mniejsze znaczenie niż niezgodności w *locus* MICA.

### 3.5. Podsumowanie

Nieklasyczne cząsteczki HLA klasy Ib (HLA-E, HLA-G czy MICA) biorą czynny udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu, modulując aktywność komórek NK oraz T za pośrednictwem szeregu receptorów. Zarówno cząsteczki HLA-E, jak i MICA aktywują lub hamują komórki NK oraz T na drodze interakcji z receptorami z rodziny CD94/NKG2, odgrywając istotną rolę w regulacji cytotoksycznej odpowiedzi komórek immunologicznych.

Dla przyjęcia się i powodzenia alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych, niezgodność w przypadku nieklasycznych HLA wydaje się mieć nieporównywalnie mniejsze znaczenie niż niedopasowanie pary dawca/biorca w zakresie klasycznych antygenów tej rodziny. Ostatnie badania sugerują jednak, że polimorfizm w obrębie genów kodujących nieklasyczne cząsteczki HLA klasy Ib (oraz ich receptory) może również istotnie wpływać na powodzenie tego typu transplantacji. Najwięcej doniesień dotyczy polimorfizmu HLA-E, a wyniki badań w większości pokazują, iż obecność allelu *HLA-E\*01:01* związana jest z raczej niekorzystnym rokowaniem, w przeciwieństwie do homozygotycznego genotypu *01:03,01:03* korelującego z mniej częstym występowaniem GvHD, lepszym prawdopodobieństwem całkowitego przeżycia, czy też przeżycia wolnego od choroby. Wykazano ponadto, iż brak doboru w HLA-E u par zgodnych w zakresie alleli klasycznych *loci* HLA podwyższa ryzyko GvHD. Dane te pokazują, iż rozszerzenie doboru pary dawca-biorca przeszczepienia o typowanie nieklasycznych *loci* HLA (co w przypadku HLA-E związane jest z wykonaniem tylko dwóch dodatkowych amplifikacji z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy, po jednej dla każdego z ulegających ekspresji alleli HLA-E), może mieć istotne kliniczne znaczenie dla doboru pary dawca-biorca alogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych i powodzenia tego typu transplantacji.

### Literatura

- [1] Bogunia-Kubik K., Lange A.: HSP70-hom gene polymorphism in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients correlates with the development of acute graft-versus-host disease, *Transplantation*, 2005; 79 (7): 815-820
- [2] Bogunia-Kubik K., Polak M., Lange A.: TNF polymorphisms are associated with toxic but not with aGVHD complications in the recipients of allogeneic sibling haematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 2003; 32 (6): 617-622
- [3] Romagnani C., Pietra G., Falco M. i wsp.: Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 11328-11333
- [4] Pacasova R., Martinozzi S., Boulouis HJ. i wsp.: Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice, *J Immunol*, 1999; 162: 5190-5196

- [5] Tamouza R., Busson M., Rocha V. i wsp.: Homozygous status for HLA-E\*0103 confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation, *Transplantation*, 2006; 82: 1436-1440
- [6] Danzer M., Polin H., Pröll J. i wsp.: Clinical significance of HLA-E\*0103 homozygosity on survival after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, *Transplantation*, 2009; 88: 528-532
- [7] Ludajic K., Rosenmayr A., Fae I. i wsp.: Association of HLA-E polymorphism with the outcome of hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors, *Transplantation*, 2009; 88: 1227-1228
- [8] Bogunia-Kubik K., Polak M., Kościńska K., Jaskuła E., Lange A.: Chromosome 6 gene polymorphisms as factors affecting HSCT outcome, 2nd European Congress of Immunology, Berlin (Germany), 13-16 September 2009, *International Proceedings 2009*, 361-364
- [9] Hosseini E., Schwarzer AP., Ghasemzadeh M.: The impact of HLA-E polymorphisms in graft-versus-host disease following HLA-E matched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2012; 11: 15-21
- [10] Bogunia-Kubik K., Jaskuła E., Gębura K. i wsp.: The impact of donor-recipient matching for non-classical HLA-E and HLA-G, and HSP70-hom (HSPA1L) on HSCT outcome, *Bone Marrow Transplant*, 2011; 46 (suppl. 1); S95 (P453)
- [11] Nguyen S., Dhedin N., Vernant J.P. i wsp.: NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect, *Blood*, 2005; 105: 4135-4142
- [12] Tamouza R., Busson M., Fortier C. i wsp.: HLA-E\*0101 allele in homozygous state favors severe bacterial infections in sickle cell anemia, *Hum Immunol*, 2007; 68: 849-853
- [13] Tamouza R., Rocha V., Busson M. i wsp.: Association of HLA-E polymorphism with severe bacterial infection and early transplant-related mortality in matched unrelated bone marrow transplantation, *Transplantation*, 2005; 80: 140-144
- [14] Iwaszko M., Marzec A., Jaskuła E. i wsp.: Associations of the CD94/NKG2A receptor gene polymorphism with the outcome of allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells, *Tissue Antigens*, 2012; 79: 468 (P88)
- [15] Espinoza J.L., Takami A., Onizuka M. i wsp.: NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies, *Haematologica*, 2009; 94 (10): 1427-1434
- [16] Boukouaci W., Busson M., Fortier C. i wsp.: Association of HLA-G low expressor genotype with severe acute graft-versus-host disease after sibling bone marrow transplantation, *Front Immunol*, 2011; 2: 1-6
- [17] Lila N., Amrein C., Guillemain R. i wsp.: Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection, *Circulation*, 2002; 105: 194-1954
- [18] Crispim J.C., Mendes-Junior C.T., Wastowski I. i wsp.: Frequency of insertion/deletion polymorphisms in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome, *Tissue Antigens*, 2008; 71: 35-41
- [19] Piancatelli D., Maccarone D., Liberatore G. i wsp.: HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism in kidney transplant patients with metabolic complications, *Trans-*

### 3. *Typowanie nieklasycznych antygenów zgodności tkankowej...*

- plant Proc, 2009; 41: 1187–1188
- [20] Twito T., Joseph J., Mociornita A., Rao V., Ross H., Delgado D.H.: The 14-bp deletion in the HLA-G gene indicates a low risk for acute cellular rejection in heart transplant recipients, *J Heart Lung Transplant*, 2011; 30: 778–782
- [21] Chiusolo P., Bellesi S., Piccirillo N. i wsp.: The role of HLA-G 14-bp polymorphism in allo-HSCT after short-term course MTX for GvHD prophylaxis, *Bone Marrow Transplant*, 2012; 47: 120-124
- [22] La Nasa G., Littera R., Locatelli F. i wsp.: The human leucocyte antigen-G 14-basepair polymorphism correlates with graft-versus-host disease in unrelated bone marrow transplantation for thalassaemia, *Br J Haematol*, 2007; 139: 284-288
- [23] Li S., Kawata H., Katsuyama Y. i wsp.: Association of polymorphic MIC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci, *Tissue Antigens*, 2004; 63: 362-368
- [24] Boukouaci W., Busson M., De Latour R.P. i wsp.: MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease, *Blood*, 2009; 114: 5216-5224
- [25] Ruggeri L., Capanni M., Urbani E. i wsp.: Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science*, 2002; 295 (5562): 2097-2100
- [26] Parmar S., De Lima M., Zou Y. i wsp.: Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease, *Blood*, 2009; 114: 2884-2887
- [27] Kitcharoen K., Witt C.S., Romphruk A.V., Christiansen ET., Leelayuwat C.: MICA, MICB, and MHC beta block matching in bone marrow transplantation: relevance to transplantation outcome, *Hum Immunol*, 2006; 67: 238-246

# IDENTYFIKACJA PRZECIWCIAŁ ANTY-HLA U CHORYCH PO PRZESZCZEPIE HEMATOPOETYCZNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Urszula Siekiera

*Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa Katowice  
Pracownia Immunogenetyki Układu HLA*

## Streszczenie

Komórki macierzyste jako samoodtworzające się progenitorowe komórki wyspecjalizowanych tkanek odpowiadają za odnowę tego co w zwykły sposób zostało zużyte, jak również tego co zostało uszkodzone. Komórki macierzyste znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny regeneracyjnej. Przeszczepienie macierzystych komórek hematopoetycznych obejmujące transplantację szpiku stanowi jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia chorób układu krwiotwórczego. Immunogenność komórek macierzystych embrionalnych jak również somatycznych jest krytycznym czynnikiem doboru dawcy oraz biorcy przeszczepu. Scenariusz immunogenności alogenicznych komórek macierzystych to polimorfizm głównego kompleksu zgodności tkankowej. Biologiczna funkcja układu zgodności tkankowej sprawia, iż układ ten stanowi centrum fazy inicjacji jak również fazy efektorowej odpowiedzi immunologicznej.

*Słowa kluczowe:* komórki macierzyste, główny kompleks zgodności tkankowej, przeciwciała anty-HLA

## 4.1. Wstęp

Konsekwencje immunologiczne wynikające z różnicy genetycznej głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) dawcy i biorcy bardzo dobrze poznane w transplantacji narządowej odnoszą się w dużym stopniu do transplantacji komórek macierzystych [1]. Mechanizm odrzucenia przeszczepu mediowany obecnością przeciwciał (ang. *antibody mediated rejection*, AMR) polegający na interakcji przeciwciał biorcy z niezgodnym antygenem HLA dawcy jest główną barierą immunologiczną transplantacji narządowej oraz komórkowej. Sytuacja jest szczególnie groźna kiedy w czasie trans-

#### 4. Identyfikacja przeciwciał anti-HLA u chorych ...

plantacji w surowicy biorcy obecne są przeciwciała klasy IgG wiążące dopełniacz skierowane do antygenów układu HLA dawcy. Początkowo uważano ich komórki macierzyste nie są immunogenne. Pogląd ten został jednak w znacznym stopniu zweryfikowany natomiast dogmat immunologicznego uprzywilejowania komórek macierzystych został odrzucony. Wcześniejsze przewidywania niskiej immunogenności komórek macierzystych odnoszą się jedynie do stadium komórek niedojrzałych. Immunogenność komórek macierzystych autologicznych czy alogenicznych embrionalnych czy dorosłych stanowi w chwili obecnej problem istotny z punktu widzenia doboru przed przeszczepem. Wiele grup komórek macierzystych wykazuje na swojej powierzchni słabą ekspresję molekuł MHC klasy I nie wykazując ekspresji MHC klasy II. Fakt ten wskazywać mógłby na immunologiczne uprzywilejowanie komórek macierzystych. Mimo iż komórki macierzyste nie wykazują ekspresji MHC początkowo mogą nabywać tę ekspresję w mikrośrodowisku poprzez kontakt z komórkami stromy, czynnikami wzrostu oraz białkami macierzy pozakomórkowego. Komórki macierzyste napotykać wiele prozapalnych cytokin IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Mikrośrodowisko oraz jego elementy razem lub z osobna modulują ekspresję molekuł MHC występujących na powierzchni komórek macierzystych. Komórki macierzyste zachowując ich podstawowe funkcje nabywają ekspresję HLA-DR i mogą prezentować antygen. Biorcy komórek macierzystych mogą posiadać przeciwciała anti-HLA częściej niż dotąd przypuszczano. Mogą to być przeciwciała skierowane do antygeny dawcy (ang. *donor sensitive antibodies*, DSA) lub też przeciwciała skierowane do epitopów nie-HLA. Nie jest jak dotąd całkowicie wyjaśniony problem DSA w przeszczepach komórek macierzystych. Wiadomo jednak, że układ odpornościowy biorcy rozpoznaje komórki macierzyste dawcy angażując w to odpowiedź komórkową oraz humoralną. Odpowiedź humoralna po transplantacji jest związana ze zmianą niskoimmunogennego profilu poprzez zwiększenie lub zmianę immunokompetentności cząsteczek MHC. Badania przedkliniczne wskazują na zwiększenie odpowiedzi immunologicznej. Wyższa ekspresja cząsteczek MHC klasy I jak również klasy II przyczynia się do produkcji przeciwciał anti-HLA. Gebel oraz Bray [2] wykazują udział przeciwciał anti-HLA jako jeden z głównych czynników uszkadzających funkcję przeszczepu. Dodatkowym problemem jest fakt, iż często wielu biorców otrzymuje niezupełnie zgodne pod względem układu HLA komórki macierzyste. Stąd wydaje się bardzo istotne identyfikowanie przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA jak również monitorowanie obecności przeciwciał po dokonanej transplantacji. Celem niniejszej pracy jest identyfikacja przeciwciał anti-HLA u chorych, u których dokonano transplantacji komórek macierzystych

## 4.2. Metodyka

Identyfikacja przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy I jak również klasy II wykonana została w grupie osób wymagających transplantacji szpiku. Surowicę krwi która stanowiła materiał do badań pobrano przed przeszczepem (66 osób), w 30 dobie po dokonanej transplantacji (43 osoby), w 100 dobie po transplantacji (45 osób) oraz rok po przeszczepie (38 osób). Badana

grupa chorych to biorcy hematopoetycznych komórek macierzystych niezgodni z dawcą w układzie HLA. Niezgodność dotyczyła *locus A*, *locus B*, *locus C*, *locus DQB1*, *locus DRB1* odpowiednio w 17, 10, 24, 11, 1 przypadkach. U trzech z badanych osób niezgodność dotyczyła *locus B* oraz *locus C*. Badania prowadzono w okresie od 2007 do 2011 roku. Identyfikację przeciwciał przeprowadzono stosując dwie techniki Procesor DynaChip oraz technikę identyfikacji przeciwciał LabScreen w systemie LUMINEX. Stosowane techniki pozwoliły na określenie obecności przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA poprzez wyliczenie wartości PRA. Stosowane metody identyfikacji przeciwciał pozwoliły na określenie klasy jak również swoistości przeciwciał. Stosowana technika LabScreen pozwoliła na identyfikację przeciwciał skierowanych do określonego antygeny HLA klasy I oraz do określonego antygeny układu HLA klasy II. Technika stosowana bardzo powszechnie w transplantacji narządowej [3].

### 4.3. Wyniki

Identyfikacja przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA przeprowadzona przed transplantacją wykazała u 35 osób (53%) obecność przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA. W grupie 19 osób (28,79%) zidentyfikowane przeciwciała skierowane były do antygenów układu HLA klasy I oraz HLA klasy II. Obecność przeciwciał skierowanych tylko do antygenów HLA klasy I wykazano u 8 osób (12,12%). Tak samo liczna była grupa chorych, u których zidentyfikowano przeciwciała skierowane tylko do antygenów układu HLA klasy II (12,12%). U 31 osób (46,97%) nie stwierdzono obecności przeciwciał anty HLA. Identyfikacja przeciwciał anty-HLA przeprowadzona w surowicy krwi pobranej w 30 dobie po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych wykazywała obecność przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy I u 3 osób (6,97%), do antygenów układu HLA klasy II u 6 osób (13,95%), przeciwciała anty-HLA skierowane do obu klas u 14 osób (32,56%) u 20 osób (46,52%) nie stwierdzono obecności przeciwciał. Wyniki badań kolejnego etapu analizy przeprowadzonej w surowicy krwi pobranej w 100 dobie po transplantacji wskazują na obecność przeciwciał anty-HLA klasy I oraz klasy II u 11 osób (24,44%), 6 osób (13,33%) badanej grupy wykazywała obecność przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy II natomiast w grupie 10 osób (22,23%) stwierdzono obecność przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy I. Pozostałe 18 osób (40%) nie wytworzyło przeciwciał anty-HLA. Badania wykonane rok po transplantacji wykazały obecność przeciwciał u 17 badanych osób (44,74%) natomiast surowice 21 osób były ujemne (55,26%). Przeciwciała skierowane do antygenów układu HLA klasy I wytworzyło 15,78 % osób przeciwciała skierowane do antygenów układu HLA klasy II 21,1% osób. Tylko w 3 przypadkach zidentyfikowano przeciwciała skierowane zarówno do klasy I jak i klasy II układu HLA stanowiło to 7,86% badanych w tym okresie osób.

Istotnym elementem prowadzonej analizy było sprawdzenie swoistości wytwarzanych przeciwciał anty-HLA w odniesieniu do niezgodności w układzie HLA dawcy oraz biorcy przeszczepu. W przypadku niezgodności dotyczącej *locus A*



#### 4. Identyfikacja przeciwciał anti-HLA u chorych ...

badanie surowicy pobranej w 30 dobie po przeszczepie identyfikowane przeciwciała skierowane były zarówno do pierwszej jak również do drugiej klasy antygenów układu HLA. W surowicach pobranych w okresie późniejszym to znaczy w 100 dobie po transplantacji oraz 1 rok po transplantacji identyfikowano głównie przeciwciała skierowane do antygenów układu HLA klasy I. Na uwagę zasługuje fakt iż w przypadku niezgodności dotyczącej *locus* A obserwowano znaczne różnice w oszacowanych wartościach PRA w przypadku niektórych niezgodnych alleli A\*03:02/A\*03:01 (PRA 1,5%) A\*02:05/A\*02:01 (60,5%). Śledząc identyfikowane przeciwciała oraz niezgodności dotyczące *locus* B obserwowano niskie wartości PRA. W grupie badanych osób niezgodność dawcy i biorcy związana z regionem HLA-C jest najczęściej obserwowana. W grupie tej identyfikowano przeciwciała o swoistości anti-HLA klasy I oraz anti-HLA klasy II. Szacowane wartości PRA mieszczą się w granicach 6-20% w przypadku przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy I oraz 15-95% w przypadku przeciwciał skierowanych do antygenów układu HLA klasy II. W grupie badanych osób niezgodnych z dawcą w *locus* DQ rzadziej w porównaniu do pozostałych niezgodności identyfikowano przeciwciała anti-HLA. Szacowane wartości PRA zawierały się w granicy 2-5%.

W badanej grupie cenna wydaje się identyfikacja swoistości wytwarzanych przeciwciał. Identyfikacja przeciwciał skierowanych do pojedynczego antygeny przeprowadzona techniką LabScreen w systemie LUMINEX pozwoliła na określenie swoistości przeciwciał anti HLA klasy I jak również anti HLA klasy II. Identyfikowane przeciwciała określono na poziomie niskiej oraz wysokiej rozdzielczości nie obserwowano zbieżności między niezgodnym allelem układu HLA a swoistością wytwarzanych przeciwciał.

#### 4.4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania wskazują na istotę problemu identyfikacji przeciwciał anti-HLA oraz monitorowanie obecności przeciwciał z punktu widzenia transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych. Liczna jest grupa chorych, u których wykazano obecność przeciwciał jeszcze przed dokonaniem przeszczepem. Ocena wpływu obecności przeciwciał identyfikowanych przed transplantacją na przebieg zabiegu oraz leczenia wydaje się być bardzo pomocna dla przeprowadzanej transplantacji. W badanej grupie osób obserwowano zróżnicowany poziom produkcji przeciwciał możliwy do oceny po oszacowaniu wartości PRA. Badania przeprowadzone w aspekcie identyfikacji swoistości wytwarzanych przeciwciał wydają się być warte kontynuacji. Wprawdzie nie wykazano bezpośredniej zależności pomiędzy niezgodnością dawca/biorca oraz swoistością wytwarzanych przeciwciał należało się tego jednak spodziewać mając na uwadze polimorfizm układu zgodności tkankowej. Dalsza analiza identyfikowanych przeciwciał odniesiona do budowy molekularnej niezgodnych alleli wydaje się być pomocna w wyznaczeniu wspólnego mianownika pomiędzy niezgodnością dawca/biorca a aktywnością odpowiedzi humoralnej.

## Literatura

- [1] Charron D., Suberbielle-Boissel C., Tamuza R., Al-Daccak R.: Anti-HLA antibodies in regenerative medicine stem cell therapy. Hum Immunol 2012; in press
- [2] Goebel H.M., Bray R.A.: Approaches for transplanting the sensitized patient: biology versus pharmacology, Nefrol Dial Transplant, 2008; 23(8): 2454-2457
- [3] Cecka J.M.: Current methodologies for detecting sensitization to HLA antigens Curr Opin Organ Transplant 2011; 16: 398

# UDZIAŁ PRACOWNI TYPOWANIA TKANKOWEGO W PROCEDURZE ALOKACJI NEREK POBRANYCH OD DAWCÓW ZMARŁYCH

Michał Kolasiński

*Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Poznań*

## Streszczenie

Aktualnie działający system alokacji nerek pobranych od dawców zmarłych nakłada na pracownię typowania tkankowego obowiązek przeprowadzenia procedury doboru immunogenetycznego. Zadanie to jest realizowane w trybie dyżurowym, w dwóch zasadniczych etapach. Pierwszy dotyczy określenia antygenów układu HLA dawcy. Drugi polega na wykonaniu próby krzyżowej pomiędzy surowicami wyselekcjonowanych biorców i limfocytami dawcy. Dodatkowo, laboratorium zaangażowane w alokację wykonuje planowe badania pacjentów Krajowej Listy Oczekujących na Przeszczepienie, w zakresie układu HLA oraz monitoruje ich stan immunizacji poprzez cykliczne określanie wartości PRA. Sprawnie przeprowadzony dobór wymaga dobrze przygotowanego zespołu pracowników oraz ścisłej współpracy ze zleceniodawcą, który powinien rozumieć i respektować wysokie wymagania dla materiału biologicznego pochodzącego od dawcy.

*Słowa kluczowe:* Cross-Match, dobór immunogenetyczny, HLA, KLO, transplantacja

## 5.1. Wstęp

System alokacji nerek pobranych od dawców zmarłych jest mechanizmem, który umożliwia sprawiedliwy wybór biorców narządów do przeszczepu, w oparciu o zbiór wytycznych, opracowanych przez zespoły ekspertów transplantologii. Sprawność tego mechanizmu jest uwarunkowana z jednej strony aktualnym stanem wiedzy medycznej, a z drugiej, bieżącymi możliwościami logistyczno - organizacyjnymi krajowego systemu opieki zdrowotnej. Oczywiście wysokość nakładów finansowych, jak w każdej działalności, nie pozostaje bez wpływu na poziom wypracowanych standardów. Właściwie funkcjonujące algorytmy alokacji

powinny uniemożliwiać bezpodstawną dyskryminację pacjentów oraz uwzględniać możliwie największą liczbę znanych czynników, jakie mogą wpłynąć na powodzenie dokonanej transplantacji.

W Polsce nadzór merytoryczny nad realizacją ustanowionych procedur przeszczepowych powierzono Centrum Organizacyjno - Koordynującemu Do Spraw Transplantacji „Poltransplant”. Na potrzeby alokacji narządów wyodrębniono w tej instytucji Krajową Listę Oczekujących na Przeszczepienie (KLO), a także stworzono stanowiska Koordynatorów Pobierania i Przeszczepiania Narządów na szczeblu centralnym, regionalnym oraz szpitalnym. W kompetencjach „Poltransplantu” leży również działalność sprawozdawcza oraz informacyjno - edukacyjna, mająca na celu podnoszenie świadomości społeczeństwa w odniesieniu do szeroko pojmowanej medycyny transplantacyjnej. W przypadku nerek pobieranych od dawców żywych bądź zmarłych, jednym z kluczowych aspektów, rzutujących bezpośrednio na tzw. czas przeżycia przeszczepu, jest bez wątpienia dobór immunogenetyczny. Ciężar tego zadania spoczywa na regionalnych pracowniach typowania tkankowego. W chwili obecnej w skali kraju funkcjonuje dziewięć placówek tego rodzaju, które biorą aktywny udział w procedurach alokacji nerek i innych narządów. Są to laboratoria zlokalizowane w Gdańsku, Katowicach, Krakowie, Łodzi, Poznaniu, Szczecinie, Warszawie (dwie pracownie) i Wrocławiu. Biorąc pod uwagę zakres wielu innych obowiązków, nałożonych na niektóre z wymienionych jednostek, oraz tryb dyżurowy pracy związanej z alokacją, świadome i odpowiedzialne podejście do omawianego zagadnienia stanowi dla pracowni niejednokrotnie ogromne wyzwanie. O ile w obecnych czasach zabezpieczenie odpowiedniego miejsca, aparatury, materiałów i odczynników nie nastręcza poważnych trudności technicznych, to zapewnienie optymalnej liczby odpowiednio wyszkolonego, doświadczonego i dyspozycyjnego personelu fachowego może być kłopotliwe.

## 5.2. Najważniejsze zasady funkcjonowania KLO

Aktualnie polski system alokacji nerek pobranych od dawców zmarłych opiera się w dużej mierze na algorytmie punktowym. Tak zwane punkty preferencyjne są przyznawane poszczególnym pacjentom z Krajowej Listy Oczekujących w ramach ustanowionych kategorii, z uwzględnieniem określonych parametrów, przedziałów czasowych, jednostek chorobowych itp. Również dopasowanie immunogenetyczne każdego potencjalnego biorcy narządu z danym dawcą podlega ocenie punktowej. Suma wszystkich punktów preferencyjnych lokuje w danym momencie każdego chorego w konkretnym miejscu listy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż obowiązujący schemat obliczeniowy nie szereguje pacjentów w określonym porządku w sposób permanentny. Kolejność biorców na liście podlega ciągłym zmianom w czasie, wynikającym z jednej strony ze statusów nadawanych poszczególnym pacjentom, a z drugiej, z niepowtarzalności każdego zgłoszonego dawcy. Status biorcy wynika przede wszystkim z jego aktualnej kondycji zdrowotnej (możliwość wykonania operacji przeszczepienia) oraz posiadania aktualnego kompletu wymaganych badań kwalifikacyjnych wraz z niezbędnymi

## 5. Udział pracowni typowania tkankowego w procedurze alokacji nerek ...

nymi konsultacjami specjalistycznymi. Unikatowość dawcy (a także każdego biorcy) wynika chociażby z profilu oznaczonych antygenów wysoce polimorficznego układu HLA. Odstępstwem, od ogólnie przyjętego protokołu sumowania punktów, jest specjalnie wydzielona kategoria dla pacjentów wymagających pilnego przeszczepienia - w tzw. trybie obligatoryjnym. Mają oni pierwszeństwo w doborze przed chorymi zgłoszonymi w trybie planowym, których jest zdecydowana większość. Kryteria kwalifikacji do trybu obligatoryjnego oraz punktacja przewidziana w odniesieniu do relacji immunogenetycznej dawca - biorca są zaprezentowane w Tabeli 5.1.

Tabela 5.1: Parametry wyboru biorcy nerki.

Parametr	Warunek	Punktacja
<b>Przeszczep obligatoryjny</b>		
1. Biorca bez dostępu do dializ, tryb pilny	C-M ujemny	Przeszczep Obligatoryjny
2. Brak niezgodnych HLA	C-M ujemny	Przeszczep Obligatoryjny
3. Dawca do ukończenia 16 r.ż. dla biorcy pediatrycznego	Wybór biorcy zgodny z zasadami systemu	Przeszczep Obligatoryjny
4. PRA $\geq$ 80%	C-M ujemny	Przeszczep Obligatoryjny
5. Biorca > 60 lat od dawcy > 65 lat	C-M ujemny	Przeszczep Obligatoryjny
6. Biorca jednoczasowego przeszczepu nerki i innego narządu	Wybór biorcy z systemu wg zasad ośrodka transplantacyjnego	Przeszczep Obligatoryjny
<b>Punkty preferencyjne*</b>		
Za każdy brak niezgodnych HLA	A	2
	B	5
	DR	10
PRA	50 – 79 %	7

\*Uwzględniono tylko kryteria immunogenetyczne. Pełne zestawienie w [2].

### 5.3. Dobór immunogenetyczny

Podstawowym zadaniem pracowni typowania tkankowego, w ramach zgłoszenia zmarłego dawcy nerek, jest przeprowadzenie szeregu czynności, składających się na dwa zasadnicze etapy, tj. oznaczenie antygenów układu HLA dawcy (typowanie tkankowe) oraz przeprowadzenie próby krzyżowej dla wyselekcjonowanych potencjalnych biorców narządu (ang. *cross-match*, C-M). Zwieńczenie każdej procedury stanowi zestawienie pacjentów ulokowanych na szczycie aktualnej listy oczekujących z jednoczesnym ujemnym wynikiem C-M. Taki dokument, przedstawiony w formie tabelarycznej, zostaje przekazany do Regionalnego Koordynatora Pobierania i Przeszczepiania Narządów, który w oparciu o zbiór ko-

lejnych wytycznych i bieżących uwarunkowań, dokonuje ostatecznego wyboru biorców do transplantacji.

Dobór immunogenetyczny jest złożonym i długotrwałym (wielogodzinnym) procesem, w którym poszczególne kroki są powiązane w logiczny ciąg określonych zdarzeń. Efekt końcowy danego etapu jest jednocześnie punktem wyjścia dla kolejnego. Należy mieć przy tym świadomość, iż dla przeprowadzania wymaganych badań jest z założenia przewidziane jedno podejście. Jakakolwiek konieczność powtórzeń niesie realne ryzyko wydłużenia czasu doboru, a to może być przyczyną dezaprobaty ze strony zespołu transplantacyjnego. W związku z powyższym wymaga się, aby personel zaangażowany w procedurę alokacji wypełniał swoje obowiązki ze szczególną starannością, pieczołowitością oraz bez nieuzasadnionej zwłoki. Dodatkowo, nabyte doświadczenie, jakie przychodzi dopiero wraz z wieloletnią praktyką, okazuje się bezcenne w sytuacjach trudnych i nietypowych.

## 5.4. Materiał do badań

Kwestią o pierwszorzędym znaczeniu dla sprawnego przeprowadzenia procedury doboru immunogenetycznego jest materiał biologiczny, pozyskiwany od dawcy. W ocenie jego przydatności do badań należy brać pod uwagę trzy aspekty: rodzaj, ilość oraz jakość. Dzięki staraniom podejmowanym przez federacje i towarzystwa immunogenetyczne, dostępnych jest szereg zaleceń i rekomendacji odnośnie próbek biologicznych, przewidzianych dla określonych badań w pracowni typowania tkankowego. Oczywiście każde laboratorium ma obowiązek i kompetencje do samodzielnego ustanowienia własnych standardów, jednak uwzględnienie w nich wytycznych instytucji uznanych za referencyjne jest gwarancją wysokiej wiarygodności końcowych wyników doboru. O ile w świadomości pracowników laboratorium dominuje przekonanie, iż stosowanie „złotych standardów” rzutuje wprost na autentyczność „dobrej praktyki laboratoryjnej”, to w przypadku strony zlecającej przeprowadzenie doboru sprawa nie zawsze jest tak oczywista. Zdarza się bowiem, iż oczekiwania pracowni uznawane są na zewnątrz za zbyt wygórowane lub wręcz nieuzasadnione i dlatego bagatelizowane, a co gorsze - ignorowane.

## 5.5. Krew obwodowa

Materiałem podstawowym, służącym za źródło DNA w analizie antygenów HLA dawcy, jest krew pełna. Antykoagulantem z wyboru, a jednocześnie najpopularniejszym środkiem przeciwkrzepliwym jest EDTA. Właściwie pobrane próbki krwi nie nastroją zwykle poważnych trudności diagnostycznych. Standardowo objętość ok. 1-2 ml pozwala na uzyskanie wystarczającej ilości materiału genetycznego o optymalnej czystości. Dobrą praktyką jest pobranie dwóch niezależnych próbek o objętości nominalnej minimum 2 ml. Pewnej ostrożności wymaga niekiedy opracowanie próbek podejrzewanych o rozcieńczenie płynami infuzyjnymi, co wiąże się z niższą wydajnością ekstrakcji DNA i konieczno-

ścią stosowania większych (wielokrotnych) objętości materiału wyjściowego. Dodatkowo, istnieje w tym przypadku ryzyko kontaminacji substancjami o właściwościach inhibitorów reakcji PCR i wówczas przeprowadzenie oznaczenia może okazać się niemożliwe. Alternatywne źródło DNA może stanowić także materiał tkankowy. Jednak należy pamiętać, iż jego głównym przeznaczeniem jest dostarczenie komórek do przeprowadzenia próby krzyżowej i ten cel powinien być traktowany priorytetowo.

## 5.6. Materiał tkankowy

Najbardziej problematycznym aspektem badań w ramach doboru immunogenetycznego jest uzyskanie odpowiedniej ilości vitalnych limfocytów dawcy narządów. Materiałem o najwyższym stopniu referencyjności są w tym przypadku węzły chłonne (najczęściej pachowe), pozyskane od dawcy jeszcze przed procedurą pobrania organów. Inną możliwością daje śródoperacyjne pobranie węzłów chłonnych krezkowych oraz fragmentów śledziony w trakcie jednoczesnego pobrania narządów. W przypadku alokacji nerek standardy OPTN jako minimalny wymóg przewidują dostarczenie: 3 - 5 węzłów chłonnych oraz wycinka śledziony 2×4 cm [3].

Do największych zalet, związanych z wykorzystaniem węzłów chłonnych, należy zaliczyć: dużą żywotność komórek, liczną reprezentację subpopulacji limfocytów B oraz wysoką czystość preparatów mikroskopowych podlegających ocenie w końcowym etapie C-M. Warto przy tym nadmienić, iż wielkość węzłów nie zawsze jest prostym wykładnikiem ich zasobności komórkowej. Proces uzyskiwania limfocytów z dobrze wypreparowanych węzłów chłonnych nie jest szczególnie trudnym zadaniem dla wprawionego pracownika. Niestety w wielu przypadkach materiał tkankowy, który dociera do pracowni, nie nosi znamion weryfikacji osoby pobierającej co do faktycznej obecności dobrze zdefiniowanych węzłów. W takiej sytuacji diagnosta musi podjąć czasochłonną próbę samodzielnego odzyskania i wypreparowania tych struktur w nadesłanej próbce, co nierzadko stanowi najtrudniejszy etap w całym postępowaniu doborowym.

Alternatywnym źródłem bardzo dużej ilości limfocytów dawcy jest śledziona. Przygotowanie zawiesiny komórek zdanej do użycia w teście CDC, na którym opiera się próba krzyżowa, jest w tym przypadku nieco bardziej problematyczne. Same komórki mogą manifestować obniżoną żywotność, a czytelność obrazów mikroskopowych pogarszają często występujące artefakty.

Na żywotność komórek w przysyłanym materiale tkankowym mogą mieć wpływ warunki przechowywania oraz transportu (zwłaszcza długotrwałego). Dlatego też warto czynić starania, aby sposób zabezpieczenia próbek był możliwie najbardziej zbliżony do wytycznych zawartych w Tabeli 5.2. W polskich realiach, najczęściej stosowanym medium do zawieszania tkanek jest powszechnie dostępny sterylny roztwór soli fizjologicznej. Takie kompromisowe rozwiązanie nie powinno jednak zwalniać personelu laboratorium z obowiązku jego weryfikacji, pod kątem satysfakcjonującej vitalności limfocytów w preparacie ujemnej próby kontrolnej, którą określa się zazwyczaj na umownym poziomie 80%. Naj-

częściej proponowaną alternatywą dla 0,9% roztworu NaCl jest niedrogi podłoże do hodowli komórkowych - RPMI.

Tabela 5.2: Materiał biologiczny wymagany w badaniach pracowni typowania tkankowego zgodnie ze „złotymi standardami” dla alokacji narządów [3].

Procedura	Rodzaj próbki	Antykoagulanty / Środki konserwujące	Temperatura przechowywania / Transportu
Typowanie HLA dawcy	Krew obwodowa	ACD Heparyna sodowa EDTA	pokojowa
Próba krzyżowa przed pobraniem narządów od dawcy	Węzły chłonne	Podłoże do hodowli tkankowych	4°C
Próbki przy pobieraniu narządów od dawcy	Węzły chłonne Śledziona	Podłoże do hodowli tkankowych	4°C

## 5.7. Oznaczanie HLA

Pacjenci zgłaszani do przeszczepienia nerki na Krajową Listę Oczekujących są kierowani do regionalnych pracowni typowania tkankowego, celem wykonania obowiązkowych badań układu zgodności tkankowej (HLA) w trybie planowym. Wyniki tych oznaczeń zostają umieszczone w bazie danych KLO i służą analizie porównawczej z profilem HLA zgłoszonego dawcy narządów.

W związku z tym, że typowanie tkankowe zmarłego dawcy można przeprowadzić jedynie w trybie dyżurowym, istnieje potrzeba zastosowania możliwie szybkiej i jednocześnie wysoce wiarygodnej techniki badawczej. Obecnie, standardowo stosowanym rozwiązaniem tego problemu jest metoda genetyczna w wariancie PCR-SSP. Zestawy testowe oparte na tej metodyce generują zazwyczaj wyniki o podstawowej rozdzielczości, najczęściej z możliwością ustalenia tzw. ekwiwalentów serologicznych, co spełnia aktualne wymagania obowiązującego systemu alokacji. Sprawnie przeprowadzona procedura daje rezultaty po około 3,5 godz. od momentu dostarczenia próbek zgodnych z ustaloną specyfikacją.

Wprowadzenie danych HLA dawcy do systemu informatycznego KLO daje możliwość wygenerowania aktualnego zestawienia chorych, z uwzględnieniem trybu przeszczepienia oraz sumą przyznanych automatycznie punktów preferencyjnych. Dodatkowo, zaimplementowany w systemie algorytm weryfikuje tzw. powtórzone niezgodności u wielokrotnych biorców przeszczepu. Stwierdzenie powtórzonej niezgodności, z aktualnie porównywanym dawcą, wyklucza danego biorcę z dalszego postępowania. Z tak uzyskanej listy, pracownicy odpowiedzialni za dobór selekcionują określoną liczbę pacjentów najwyższej lokowanych i przeprowadzają sprawdzenie dostępności surowic celem wykonania próby krzyżowej.



## 5.8. Próba krzyżowa

Jednym z podstawowych założeń funkcjonującego obecnie systemu alokacji nerek, jest zapewnienie równego dostępu do pozyskiwanych narządów dla wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do transplantacji. Postulat ten stał się możliwy do zrealizowania dzięki powołaniu na drodze konkursu Ośrodka Redystrybucji Surowic przy Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. Działalność ośrodka skupiona jest na zadaniu gromadzenia pierwotnych próbek surowic, nadsyłanych ze wszystkich stacji dializ, które dysponują pacjentami przewidzianymi do leczenia przeszczepowego. W chwili obecnej liczba tego typu jednostek dializoterapii wynosi blisko 280. Każda z nich ma obowiązek dostarczania próbek według ustalonego harmonogramu, co 6 tygodni. Zdeponowane w Ośrodku Redystrybucji surowice są sukcesywnie dzielone na wymaganą ilość próbek pochodnych (aktualnie 9), które z kolei są rozsyłane do wszystkich regionalnych pracowni zgodności, zaangażowanych w systemie alokacji. Dzięki takiemu mechanizmowi każde laboratorium wykonujące procedurę doboru, dysponuje zestawem okresowo wymienianych surowic, od wszystkich chorych aktywnych na Krajowej Liście Oczekujących.

Przeprowadzenie próby krzyżowej możliwe jest po uprzednim odzyskaniu limfocytów z materiału tkankowego dawcy i podzieleniu ich na subpopulacje T i B. Jeszcze do niedawna popularną techniką rozdziału komórek była separacja na odpowiednio spreparowanych włóknach waty nylonowej. Obecnie metodą preferowaną jest wykorzystanie gotowych zestawów przeciwciał monoklonalnych oraz kolumn ze złożem paramagnetycznym.

Próba krzyżowa (ang. *cross-match*, C-M) polega na wykonaniu badania surowic wyselekcjonowanych pacjentów KLO z limfocytami dawcy w technice CDC (cytotoksyczność zależna od dopełniacza). Zadaniem testu jest sprawdzenie, czy w organizmie potencjalnego biorcy narządu nie krążą preformowane przeciwciała anty HLA dawcy, wiążące dopełniacz, które niosą ryzyko wystąpienia ostrego procesu odrzucania. Pacjenci, u których zostanie stwierdzona reakcja cytotoksyczna (C-M dodatni, próba krzyżowa niezgodna) nie mogą otrzymać przeszczepu i są wykluczani z ostatecznego zestawienia biorców.

Wskazówką diagnostyczną, która określa prawdopodobieństwo wystąpienia dodatniej reakcji w teście CDC jest wartość PRA (ang. *panel reactive antibodies*). Każdy pacjent zgłaszany do przeszczepu nerki podlega obowiązkowemu okresowemu (co 3 miesiące) badaniu przeglądowemu pod kątem obecności przeciwciał preformowanych w ustroju. Weryfikacji dokonuje się w drodze planowego szeregu kilkudziesięciu (30 - 100) prób krzyżowych na świeżo pobranej surowicy pacjenta oraz wyizolowanych, nierozdzielonych limfocytach krwi obwodowej losowo wybranych dawców. Wynik badania, wyrażony w formie odsetka stwierdzonych reakcji cytotoksycznych może się mieścić w przedziale 0 - 100%.

## 5.9. Podsumowanie

Na przestrzeni ostatnich lat zasady dystrybucji nerek pobranych od dawców zmarłych ulegały gruntownym przemianom. Wdrożenie informatycznego sys-

temu Krajowej Listy Oczekujących na przeszczepienie oraz jego ewolucja do postaci Ustawowych Rejestrów Transplantacyjnych, umożliwiły dostęp *on-line* do obszernej bazy danych o pacjentach dla wszystkich podmiotów, zaangażowanych w procedury transplantacyjne. Jednocześnie, stworzenie Ośrodka Redystrybucji Surowic dało realną szansę wszystkim chorym na równy dostęp do pozyskiwanych narządów. W najbliższym czasie należy spodziewać się, iż diagnostyka immunologiczna potencjalnych biorców zostanie uzupełniona o nowe elementy, związane z bardziej wnikliwą oceną immunizacji wszystkich pacjentów. Starania te z pewnością zapoczątkują kolejne zmiany, tym razem dotyczące sposobu przeprowadzania doboru immunogenetycznego. Kwestią nadal otwartą pozostaje udział pracowni typowania tkankowego w monitorowaniu pacjentów po wykonaniu przeszczepu. Już teraz dostępnych jest coraz więcej narzędzi badawczych, ukierunkowanych na diagnostykę potransplantacyjnych czynników prognostycznych. Obecnie nie ma jednoznacznych ustaleń w tym temacie, a obserwowane działania pojedynczych ośrodków przeszczepowych mają charakter lokalny i pilotażowy.

## Literatura

- [1] Antoniewicz-Papis J., Fabijańska-Mitek J., Nowak J., Piątosza B., Sawicka J.: Immunogenetyczne podstawy doboru dawców oraz przeszczepiania komórek krwiotwórczych i narządów. Onipharma Sp. z o. o., Warszawa 2007
- [2] Czerwiński J., Malanowski P. i wsp.: Nowe zasady dystrybucji i alokacji narządów. Biuletyn Informacyjny, Poltransplant, 2012; 1(20): 6-19
- [3] OPTN/ UNOS Committee: Talking About Transplantation. Specimens for Histocompatibility Testing. Guidelines for OPOs, 2006
- [4] Sutherland S.M., Chen G., Sequeira F.A., Lou C.D., Alexander S.R., Tyan D.B.: Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplantation*, 2012; 16: 12-17
- [5] Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G. i wsp.: Znaczenie diagnostyczne swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorych przed i po transplantacji nerek. Programy dla wysoko zimmunizowanych. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2009; 63: 435-448

# IDENTYFIKACJA PRZECIWCIAŁ ANTY-HLA JAKO BADANIE ZAPOBIEGAJĄCE ODRZUCANIU HUMORALNEMU U BIORCÓW NEREK PODWYŻSZONEGO RYZYKA IMMUNOLOGICZNEGO

Grażyna Moszkowska

*Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii,  
Gdański Uniwersytet Medyczny*

## Streszczenie

Przeszczepianie narządów unaczynionych pacjentom uczulonym obarczone jest wysokim ryzykiem odrzucania i gorszym przeżyciem przeszczepu [1]. Zimmunizowani potencjalni biorcy nerek dłużej czekają na dawcę ujemnego w przedprzeszczepowej próbie krzyżowej. Wykazano, że przeciwciała anty-HLA mają decydujący wpływ na odrzucanie nadostre, a ich znaczenie wykazano także przy odrzucaniu ostrym i przewlekłym [2]. W ostatnich latach dzięki nowym metodom badawczym możliwe stało się wykrywanie alloprzeciwciał anty-HLA na poziomie wysokiej czułości oraz jakościowa identyfikacja swoistości. Precyzyjna charakterystyka przedprzeszczepowa przeciwciał u biorcy i dokładne określenie HLA dawcy pozwala uniknąć okołoprzeszczepowego odrzucania nadostrego, a dzięki właściwemu monitorowaniu po transplantacji, możliwe jest rozpoznanie aktywacji humoralnej reaktywności biorcy, monitorowanie produkcji przeciwciał *de novo* i w konsekwencji podjęcie odpowiedniego leczenia. Postępy terapii immunosupresyjnych w połączeniu z coraz lepszą diagnostyką laboratoryjną umożliwiają pomyślne transplantacje również u pacjentów należących do grupy podwyższonego ryzyka immunologicznego.

*Słowa kluczowe:* przeszczepianie nerek, ryzyko immunologiczne, przeciwciała anty-HLA, przeciwciała swoiste dla dawcy DSA, próba krzyżowa, X-Map Luminox

## 6.1. Problem alloimmunizacji w transplantacji nerek

Uczuleni potencjalni biorcy nerek mają znacznie mniejszą szansę na przeszczep. Obecne w ich surowicy alloprzeciwciała powodują, że przedprzeszcze-

pową próbą krzyżową jest dodatnia i pacjent, zgodnie z przyjętymi standardami, nie może być zakwalifikowany do transplantacji. Ma to wpływ na wydłużenie czasu oczekiwania na liście oraz wzrost śmiertelności w oczekiwaniu na przeszczepienie [3]. Wysokie ryzyko przeszczepu nerki u pacjenta uczulonego musi być więc rozważane wobec klinicznego ryzyka pozostania na dializach. Nawet jeżeli cross-match jest ujemny i uczulony pacjent zostanie przeszczepiony, to ryzyko uszkodzenia i utraty przeszczepu z powodu odrzucania humoralnego jest wysokie [4, 5]. Wykazano, że odrzucanie humoralne (ang. *antibody mediated rejection*, AMR) związane jest z obecnością niewykrytych niskich poziomów przeciwciał anty-HLA swoistych dla dawcy (ang. *donor specific antibodies*, DSA) powodujących uszkodzenie przeszczepionej nerki bezpośrednio po transplantacji, a wytwarzanie *de novo* przeciwciał DSA oraz innych przeciwciał wpływa na przewlekłe odrzucanie i niewydolność przeszczepu [6]. Przeszczepianie nerek pacjentowi zimmunizowanemu wymaga szczególnej uwagi, dlatego stworzone zostały specjalne programy umożliwiające właściwy dobór dawcy. Bardzo ważnym parametrem, który pomaga realizować program przeszczepiania pacjentów podwyższonego ryzyka immunologicznego jest wykrywanie i ocena klinicznie ważnych alloprzeciwciał. Gebel i wsp. [7] proponuje 3 główne kategorie ryzyka w układzie biorca – dawca. Wysokie ryzyko immunologiczne jest wówczas, gdy w surowicy biorcy obecne są duże stężenia przeciwciał swoistych dla niezgodnych z dawcą antygenów HLA. W większości przypadków wysokie ryzyko wystąpienia odrzucania nadostrego powoduje odstępianie od transplantacji. Są jednak ośrodki przeszczepiające takich chorych, po dokładnie zaplanowanym przedtransplantacyjnym odczulaniu oraz dokładnym, potransplantacyjnym monitorowaniu immunologicznym. Pośrednie ryzyko immunologiczne jest wtedy, gdy występują czynniki ryzyka, takie jak występowanie w przeszłości przeciwciał anty-HLA dawcy, nieobecne w czasie doboru w bieżącej próbce surowicy. W takich przypadkach należy rozważyć zwiększenie immunosupresji i potransplantacyjne monitorowanie. Niskie (standardowe) ryzyko immunologiczne – jest wówczas, gdy pacjent jest niezimmunizowany lub nawet zimmunizowany, ale otrzymuje narząd minimalnie niezgodny w układzie HLA, przy ujemnej próbie krzyżowej w surowicy bieżącej i historycznej.

Ekspozycja układu immunologicznego na obce antygeny – takie jak ciąża, transfuzja krwi, transplantacja, powoduje uczulenie skutkujące wytworzeniem przeciwciał anty-HLA. Zaskakująco, stwierdzono przeciwciała anty-HLA także u ludzi bez wyraźnej przyczyny uczulenia. Idiopatyczne przeciwciała są zazwyczaj klasy IgM i mogą pojawić się jako wynik reakcji krzyżowej w związku z infekcjami. Ostatnio przy użyciu testów wysokiej czułości, fazy stałej, wykryto przeciwciała IgG HLA swoiste w surowicy zdrowych osób, bez incydentów immunizacji w przeszłości, ale ich znaczenia klinicznego jeszcze nie poznano [25].

Zrozumiały i obszerny program identyfikacji przeciwciał powinien być wsparciem ze strony laboratorium w programie transplantacji narządów unaczynionych. Badania powinny pozwolić na identyfikację dodatnich surowic anty-HLA, a następnie określenie ich swoistości. Przed przeszczepieniem stopień zimmunizowania pacjenta może zmieniać się w czasie i dlatego monitorowanie musi

być regularne, a zespół kliniczny powinien informować o możliwych incydentach uczulających, również o infekcjach. Surowica chorego powinna być badana co 3 miesiące (lub 2–4 tygodni po uczuleniu). Po przeszczepie synteza *de novo* przeciwciał anti-HLA swoistych dla dawcy związana jest z odrzucaniem ostrym i przewlekłym [8]. Wskazane jest potransplantacyjne monitorowanie przeciwciał w zależności od stanu klinicznego pacjenta oraz jego stopnia immunologicznego ryzyka. Podkreślić jednak należy, że w Polsce takie monitorowanie nie jest jeszcze standardowo wykonywane.

## 6.2. Przedtransplantacyjna identyfikacja alloprzeciwciał

Dokładne przedtransplantacyjne określenie przeciwciał pozwala przewidzieć reaktywność biorcy na dawcę. Porównanie zgodności tkankowej wykonywane jest w zakresie antygenów HLA z *loci* A, B, DR. Jednakże immunologiczna utrata przeszczepu przez biorców z grupy podwyższonego ryzyka immunologicznego przy pełnej zgodności w tych antygenach wskazuje na rolę przeciwciał anti HLA –Cw, -DQ, -DP i konieczność doboru w rozszerzonym zakresie HLA [9].

### 6.2.1. Testy komórkowe

Pierwszą metodą umożliwiającą wykrycie przeciwciał anti-HLA była cytotoksyczność zależna od komplementu (ang. *complement dependent cytotoxicity*, CDC), w której komórkami docelowymi dla przeciwciał IgG i IgM wiążących dopełniacz są limfocyty. Test CDC używany jest przy badaniu obecności przeciwciał anti-HLA, niestety nie pozwala na identyfikację ich swoistości. Mimo powszechnego nadal zastosowania, wiąże się z nim kilka problemów. Zależy od zmiennego panelu limfocytów, a na swoistość i czułość testu wpływa żywotność komórek i jakość króliczego komplementu. Źródłem limfocytów jest krew obwodowa. Niski odsetek limfocytów B sprawia, że wykrycie obecności przeciwciał anti-HLA klasy II może być trudne. Równocześnie należy pamiętać, że wykrywane są przeciwciała wiążące komplement, które nie zawsze są HLA swoiste. Wyniki testu CDC przedstawiane są jako odsetek komórek panelu, z którymi surowica reaguje (% PRA). Odsetek PRA CDC oznacza prawdopodobieństwo znalezienia właściwego dawcy – im wyższy, tym mniejsza szansa na przeszczep. Przy mało zróżnicowanym panelu limfocytów wzorcowych wynik testu nie odzwierciedla prawdziwego stopnia immunizowania chorego. Do tego dołącza się problem fałszywie pozytywnych wyników z powodu autoprzeciwciał dających 100% PRA, a prawdopodobnie nieistotnych dla losów przeszczepu (20). W teście CDC autoprzeciwciała mogą być usunięte przez absorpcję z autologicznymi limfocytami i/lub dodanie dithiothreitolu (DTT) w celu usunięcia przeciwciał klasy IgM. Dodanie DTT umożliwia usunięcie fałszywie pozytywnych autoreaktywnych przeciwciał IgM, jakkolwiek może to spowodować również usunięcie przeciwciał IgM alloreaktywnych. Wymienione powyżej ograniczenia oznaczają, że stopień uczulenia pacjenta nie powinien być określany tylko w oparciu o odsetek PRA CDC.

Czulszą metodą komórkową jest cytometria przepływowa. Test oznaczania alloprzeciwciał na cytometrze przepływowym wykorzystuje pulę komórek zapro-

jektowanych tak, by pokrywały wszystkie główne swoistości HLA i serologicznie krzyżowo – reagujące grupy. Wykorzystano do tego celu limfocyty od chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną (CLL) komórki limfoblastyczne z linii komórkowych, które były zainfekowane EBV, a także limfocyty krwi obwodowej. Oznaczanie surowic w cytometrze z pojedynczymi panelami komórek jest niewygodne na dużą skalę, wobec tego opcją jest pulowanie komórek, co pozwala na badanie większej liczby surowic w krótszym czasie i jest czulsze niż CDC. Surowice dodatkowo mogą być następnie badane pod kątem swoistości w cytometrze przy użyciu pojedynczych paneli komórkowych. Użycie linii komórkowych z ekspresją pojedynczych antygenów HLA w cytometrze przepływowym umożliwia identyfikację antygenów HLA na które pacjent nie ma przeciwciał [10].

### 6.2.2. Testy fazy stałej

Testy fazy stałej z użyciem oczyszczonych, rekombinowanych cząsteczek HLA umieszczonych na dnie studzienki lub powierzchni polistyrenowych mikrokulek w znaczący sposób poprawiły wykrywanie i charakterystykę alloprzeciwciał u pacjentów immunizowanych. Nie wymagają żywych limfocytów, przeznaczone są do wykrywania przeciwciał swoistych dla HLA. Do wykonania badań stosowany jest fluorymetr przepływowy (Luminex), cytometr przepływowy lub czytnik ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Testy ELISA po raz pierwszy wprowadzono w latach 90-tych. Testy umożliwiają ocenę obecności lub braku przeciwciał oraz określenie ich swoistości. Czulość testów ELISA jest wyższa niż CDC, ale niższa niż w cytometrii przepływowej [11]. Współcześnie najczulszy jest test X-Map Luminex, umożliwiający wykrywanie nawet niskich stężeń przeciwciał anty-HLA. Metoda ta jest połączeniem techniki multipleksowej (fluorescencyjne mikrokulki pokryte oczyszczonymi antygenami HLA klasy I lub II) z techniką cytometrii przepływowej. Wysoka czulość metody wymaga dodatkowo określenia, które z wykrywanych przeciwciał są ważne klinicznie. Bezwzględna ocena wartości MFI (ang. *median fluorescent intensity*) nie jest właściwym parametrem, ponieważ wykazano, że różnica w natężeniu fluorescencji może być zależna od partii odczynnika [12]. Badania wskazują, że klinicznie ważne są przeciwciała aktywujące klasyczną drogę układu dopełniacza. C1q jest pierwszą składową aktywacji układu dopełniacza, czego ostatecznym skutkiem są złogi C4d wykrywane immunohistochemicznie w odrzucanej tkance. Wydaje się, że test C1q-SAB (ang. *Single Antigen Bead*) z wysoką czulością i swoistością wykrywa wiążące komplement przeciwciała anty-HLA [13].

Po identyfikacji swoistości przeciwciał anty-HLA u zimmunizowanego biorcy można ustalić nieakceptowane antygeny i porównać z wielotysięczną bazą danych o populacyjnej częstości występowania określonych HLA, identycznych w układzie AB0 dawca-biorca, (np. baza danych Eurotransplantu). Obliczona częstość dodatnich reakcji wynikających z obecności przeciwciał anty-HLA wyrażana jest jako % niezgodnych dawców. W ten sposób możliwe jest uzyskanie informacji o prawdopodobieństwie wystąpienia dodatniej reakcji w populacji określonej jako wirtualne PRA (vPRA).

## 6. Identyfikacja przeciwciał anti-HLA ...

Testy identyfikujące antygenowe swoistości (ang. *single antigen*, SA) mogą być szczególnie przydatne do badania profilu przeciwciał pacjenta w celu ustalenia najlepszych HLA dawcy, a także przy monitorowaniu przeciwciał po ich przedtransplantacyjnym usuwaniu lub identyfikacji DSA – przeciwciał swoistych dla dawcy w okresie potransplantacyjnym (40). Współczesne testy umożliwiają identyfikację na poziomie alleli [14] co oznacza, że wcześniej oznaczone swoistości jako zgodne z dawcą, mogą skutkować wykryciem przeciwciał związanych z odmiennością alleliczną.

Technika Luminex „single antigen” umożliwia dokładne definiowanie epitopów i wskutek tego rozumienie reaktywności przeciwciał. HLA Matchmaker jest komputerowym algorytmem, który porównuje zgodność HLA na poziomie struktury poprzez analizę sekwencji tripletów aminokwasów lub strukturalnych zbiorów aminokwasów [15]. Wykazano, że niezgodności w tripletach korelują z produkcją przeciwciał wykrywanych przy użyciu SA na Luminex-ie, a takie badanie pozwala ustalić profil pacjenta uczulonego i zidentyfikować nie tylko te epitopy HLA, przeciwko którym pacjent wytworzył przeciwciała, ale także do których niezgodności prawdopodobnie zareaguje.

Przy definiowaniu nieakceptowanych niezgodności, czyli określaniu antygenów HLA przeciwko którym pacjent ma przeciwciała, należy również uwzględnić niezgodne antygeny poprzednich przeszczepów, przeciwko którym nie wykazano przeciwciał. Nawet jeśli na bieżąco przeciwciała nie są wykrywane, istnieje pamięć immunologiczna, czego skutkiem może być wtórna, przyspieszona reakcja.

### 6.3. Próba krzyżowa

Celem wykonania próby krzyżowej (ang. *cross-match*, XM) jest ustalenie obecności przeciwciał anty dawca, czyli uzyskanie informacji o szacowanym ryzyku immunologicznym. Wynik jest informacją o klinicznym znaczeniu najwyższej wagi i ocenia potencjalne ryzyko każdego przeszczepu. Wykazano, że przeciwciała anty AB0 i anty-HLA powodują nadostre odrzucanie. Prospektywna próba krzyżowa może wskazać pacjenta o wysokim ryzyku utraty przeszczepu i zdecydować o odstąpieniu od transplantacji.

Najstarszą techniką, nadal stosowaną w diagnostyce rutynowej, jest test CDC [16]. Już w 1969 r. wykazano jego wartość przewidywania nadostrego odrzucania. Metoda CDC wykrywa przeciwciała wiążące dopełniacz, zarówno swoiste jak i nieswoiste dla HLA. Czulszą techniką pozwalającą wykryć w próbie krzyżowej przeciwciała anty dawca jest cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry cross match*, FCXM) [17]. Wadą tej metody jest jednak zwiększony odsetek wyników fałszywie dodatnich, związanych z wykryciem przeciwciał nieistotnych klinicznie. Próby wykonywania XM w oparciu o testy fazy stałej np. X-Map Luminex nie uprawniają jeszcze do ich szerokiego użycia [18].

Surowica do próby krzyżowej pobrana przed przeszczepem odzwierciedla bieżący status uczulenia przeciw dawcy. Jeśli wiadomo, że nie było incydentu uczulającego, można akceptować surowice pobrane wcześniej, ale nie starsze niż

3 miesiące. Dla pacjentów immunizowanych dodatkowo zalecane jest badanie z zestawem historycznych próbek surowic, reprezentatywnych dla statusu biorcy.

Wynik ujemny próby krzyżowej CDC oznacza, że biorca nie ma przeciwciał przeciw dawcy lub są poniżej poziomu wykrywalności w teście. Wynik dodatni może oznaczać obecność przeciwciał anty-HLA lub może być wynikiem obecności innych przeciwciał wiążących dopełniacz. Przeciwciała wiążące zarówno T jak i B limfocyty najprawdopodobniej są skierowane przeciw antygenom HLA klasy I. Próba krzyżowa pozytywna z limfocytami B i negatywna dla T oznacza obecność przeciwciał przeciw klasie I lub II HLA lub autoprzeciwciał (autoprzeciwciała można wykluczyć w reakcji autologicznej). Dodatnia reakcja z limfocytami T przy braku wiązania przeciwciała do limfocytów B sugerować może, że przeciwciała nie jest HLA swoiste.

Dodatkowo ważna klinicznie jest informacja o klasie przeciwciał (G lub M) i czasie ich występowania (bieżące versus historyczne). Obecność przeciwciał klasy IgG anty HLA –A lub –B [16] oraz -DR [19] wobec dawcy w bieżącej surowicy w większości przypadków powodują odrzucanie nadostre przeszczepionej nerki. Znaczenie kliniczne dodatniej próby krzyżowej w surowicach historycznych jest dyskusyjne. Przypuszcza się, że może pojawić się wczesna odpowiedź humoralna związana z aktywacją limfocytów T pamięci, które pośredniczą w ostrym odrzucaniu przeszczepu. Decyzja o przeszczepianiu pacjentów z przeciwciałami obecnymi w historycznych próbkach surowic powinna być związana z ustaleniem odpowiedniego postępowania poprzyszczepowego. W przypadku przeszczepów od żywych dawców, gdzie nie ma możliwości pobierania węzłów chłonnych lub śledziony, decyzja o transplantacji, szczególnie wobec biorców uczulonych, powinna opierać się na wynikach otrzymanych metodą cytometrii przepływową (FCXM). Wieloośrodkowe badania porównania losów przeszczepów w zależności od wyników FCXM wykazała najlepsze przeżycie przeszczepu gdy był ujemny z komórkami T i B, pośredni przy dodatnim FCXM B i najgorsze przy dodatnim FCXM T i B [20]. To samo zaobserwowano w odniesieniu do pojawienia się odrzucania przewlekłego [21].

## 6.4. Przedtransplantacyjna wirtualna próba krzyżowa

Wirtualna próba krzyżowa (ang. *virtual cross-match*, vXM) oznacza przewidywanie wyniku próby krzyżowej w oparciu o obszerną wiedzę o braku przeciwciał lub o swoistościach wszystkich wykrytych przeciwciał i ich potencjalnej reaktywności z dawcą. W przypadku pacjentów uczulonych przygotowana lista nieakceptowanych antygenów HLA dawcy pozwala określić wynik vXM i wykluczyć pacjenta jako biorcę. Taki sposób przewidywania wyniku jest przydatny w krajach, gdzie nerka wysyłana jest do biorcy, gdyż znacząco wpływa na zmniejszenie czasu zimnego niedokrwienia [23]. Wobec chorych nieimmunizowanych vXM pozwalały ominąć przedtransplantacyjną próbę krzyżową [22]. Niektóre ośrodki transplantacyjne rozważają możliwość wyodrębnienia takiej grupy chorych. Wykazano, że strategia taka jest możliwa [24]. Próby krzyżowe wykonane retrospektywnie były wszystkie ujemne, wskazując, że przewidywania co do tak



ostrożnie wybranej grupy biorców były wiarygodne, a takie postępowanie skutkowało znacząco krótszym czasem zimnego niedokrwienia [22]. Równocześnie jednak, przy określaniu vXM, stwierdzono zwiększoną częstość ujemnych prób krzyżowych u pacjentów, dla których zidentyfikowano w testach fazy stałej przeciwciała anti-dawca. Obserwacja ta wskazuje na „nadczułość” metody, powodującą fałszywie dodatni vXM, tzn. przypadki, gdy XM ostateczny nie potwierdza przewidywanego wyniku. W kolejnych badaniach wykazano, że testy fazy stałej wykrywają przeciwciała u osób nieuczulonych [25]. Takie przeciwciała opisano jako „naturalne”, być może klinicznie nieistotne. Autorzy sugerują, że powstają one w odpowiedzi na patogeny lub alergeny i reakcja dodatnia zależy od krzyżowo reagujących epitopów. Możliwe również, że w procesie opłaszczania mikrokulek (testy SA) cząsteczki HLA ulegają denaturacji i ujawniają się epitopy, które w naturalny sposób nie są eksponowane na powierzchni komórki. Fakty te sugerują, że o ile ujemny vXM (w oparciu o testy X-Map Luminex) jest wiarygodnym wskaźnikiem dla przeżycia przeszczepu, to interpretacja dodatniego wyniku jest mniej bezpośrednia [26].

### 6.5. Przeciwciała po przeszczepieniu nerki

Ważnym parametrem diagnostycznym po przeszczepieniu nerki może być badanie pojawiania się w surowicy biorcy alloprzeciwciał. Mogą być one ujawnione w próbie krzyżowej z komórkami dawcy lub w testach fazy stałej, oceniających przeciwciała. Wykazano, że 12-60 % biorców po transplantacji nerek wytwarza *de novo* przeciwciała anti-HLA [27]. Różne czynniki wpływają na te dane – typ i czułość testu, czynniki kliniczne, takie jak stopień niezgodności pomiędzy dawcą a biorcą, a także protokół immunosupresji. Wytworzenie przeciwciał związane jest z gorszym przeżyciem przeszczepu. Biorcy, u których pojawiają się swoiste przeciwciała anti-HLA mają większą częstość ostrego odrzucania i przewlekłej niewydolności narządu, aniżeli chorzy ich nie wytwarzający. Wykazano, że produkcja *de novo* DSA ma silne znaczenie prognostyczne dla losów przeszczepu.

Oprócz klasycznych antygenów HLA, które przy niezgodności są celem dla przeciwciał, obecne są inne polimorficzne antygeny, odgrywające rolę w procesie odrzucania. Opisano przeciwciała przeciw antygenom MICA obecne w surowicy przeszczepionych biorców [27]. Przeciwciała te mogą mieć szczególne znaczenie ze względu na obecność antygenów MICA na nabłonku kanalików nerkowych. Ponieważ na limfocytach antygenów tych nie ma, przedprzeszczepowe określenie obecności przeciwciał anti-MICA jest niestety niemożliwe.

Innym markerem humoralnego odrzucania są wykrywane immunohistochemicznie w biopsjach złogi białka dopełniacza C4d. Po aktywacji zależnej od przeciwciał klasycznej drogi dopełniacza, białko dopełniacza C4d zostaje kowalencyjnie związane z powierzchnią śródbłonka. Stwierdzono, że krążące DSA są obecne u biorcy wyprzedzająco wobec C4d [28]. Wykazano, że obecność C4d w okołokanalikowych kapilarach przeszczepionej nerki jest wiarygodnym markerem odrzucania humoralnego i potransplantacyjnej produkcji przeciwciał przeciw dawcy. Badania biopsji uzyskanych w czasie niewydolności allograftu nerki

wykazały, że złogi C4d w kapilarach okołonaczyniowych obecne są w ok. 30% biopsji w ostrym odrzucaniu, chociaż ich brak nie wyklucza odrzucania zależnego od przeciwciał [29].

## **6.6. Obniżanie reaktywności humoralnej biorców wysokiego ryzyka immunologicznego**

Chorzy z szerokim spektrum przeciwciał anti-HLA, są skazani na bardzo długie, często wieloletnie oczekiwanie na przeszczepienie. Niektórzy z nich z czasem tracą przeciwciała, inni zachowują je w wysokim mianie przez wiele lat. Mechanizmy regulujące naturalne obniżenie poziomu przeciwciał wciąż nie są w pełni zrozumiałe. Szansą na pomyślną transplantację dla tych pacjentów jest zastosowanie specjalnych programów opierających się o procedury usunięcia alloprzeciwciał, oraz dobór dawcy z najlepszym dla biorcy profilem HLA. Głównym argumentem za usuwaniem przeciwciał były pomyślne transplantacje przeprowadzone u chorych z ujemną próbą krzyżową z bieżącą surowicą przy dodatniej reakcji w surowicy historycznej. Należy podkreślić, że DSA wykrywane w testach fazy stałej nie są bezwzględnym przeciwwskazaniem do transplantacji, ale muszą być traktowane jako czynnik ryzyka, zwłaszcza przy bardzo wysokich przed- i potransplantacyjnych wartościach MFI [30,31] Wykazano, że całkowite usunięcie przeciwciał jest rzadko uzyskane. Obniżenie przeciwciał do poziomu uznawanego za wystarczające klinicznie jest wówczas, gdy wynik próby krzyżowej w konwencjonalnych metodach jest ujemny [32].

Przed transplantacją możliwe jest odczulanie pacjentów poprzez zabiegi obniżające miano przeciwciał, takie jak dożylnie wlewy immunoglobulin (IVIg), plazmafereza, immunoadsorpcja (IA). Dokładny mechanizm działania IVIg nadal nie jest w pełni poznany [33], wiadomo, że neutralizuje przeciwciała anti-HLA poprzez tworzenie sieci wiązań anti-idiotypowych, hamowanie aktywacji układu dopełniacza, uwalnianie cytokin przeciwzapalnych, hamowanie proliferacji limfocytów B oraz hamowanie dojrzewania i aktywności komórek dendrytycznych. Wykazano jednak, że redukcja DSA metodą IVIg jest mało wydajna i krótkotrwała. Pacjenci z wysokim mianem przeciwciał DSA muszą mieć wykonaną dodatkowo przedprzeszczepowo plazmaferezę lub immunoadsorpcję. W celu zapobieżenia tworzenia po transplantacji alloprzeciwciał stosuje się terapię anti-CD20 (rituximab), dla której komórkami docelowymi są limfocyty B [34], a także inhibitory proteasomów (bortezomib). Najnowsza metoda obniżania reaktywności humoralnej biorcy polega na blokowaniu aktywacji dopełniacza. Monoklonalne przeciwciało eculizumab blokuje czynnik C5 układu dopełniacza zapobiegając wytwarzaniu prozapalnego białka C5a i kompleksu atakującego błonę komórkową C5b-9 [35].

W grupie pacjentów odczulanych potransplantacyjne monitorowanie alloprzeciwciał jest szczególnie ważne. W obecnej chwili najbardziej użyteczne do śledzenia zmian poziomu DSA są testy umożliwiające identyfikację swoistości antygenowych techniką X-Map Luminex. Mogą one wykazywać wczesne zmiany, lub utrzymywanie się potransplantacyjnych przeciwciał DSA. Opisano przypadki

dobrze funkcjonującego przeszczepu przy równocześnie rosnących poziomach przeciwciał anty dawca, chociaż zasadniczo resynteza i wzrost poziomu DSA związane są z odrzucaniem [36]. Monitorowanie poprzyszczepowe DSA powinno być dostosowane do stanu klinicznego biorcy, wyników badań histopatologicznych oraz innych czynników ryzyka.

## 6.7. Posumowanie

Poprawna identyfikacja alloprzeciwciał u biorców podwyższonego ryzyka immunologicznego wpływa bezpośrednio na powodzenie transplantacji. Współpraca diagnostycznego laboratorium z kliniką jest niezbędna do prawidłowej oceny biorcy przed transplantacją, doboru najlepszego dawcy oraz właściwego monitorowania potransplantacyjnego. Zespół kliniczny musi informować laboratorium o potencjalnych incydentach uczuleniach, takich jak poprzedni przeszczep, transfuzja krwi, ciąża (również poronienia) oraz ostatnie infekcje i szczepienia. Laboratorium powinno umieć precyzyjnie oznaczyć poziom oraz swoistość przeciwciał anty HLA –A, -B, -Cw, –DR, -DQ, -DP u potencjalnych biorców, tak by możliwe było dobranie najlepszego, ujemnego w próbie krzyżowej dawcy [37]. Scharakteryzowane u biorcy przeciwciała powinny umożliwić ustalenie nieakceptowanych HLA u dawcy. Przeciwciała muszą być regularnie monitorowane przed transplantacją. Pacjenci wysoko immunizowani muszą mieć określoną swoistość i poziom DSA przed odczulaniem oraz w trakcie leczenia w celu określenia efektywności desensytyzacji. Przedprzeszczepowa próba krzyżowa CDC musi być wykonana u wszystkich biorców. Dopuszczalny jest wyjątek, w ośrodkach przeszczepowych gdzie istnieje specjalny program umożliwiający pewną identyfikację chorych zdefiniowanych jako nieuczuleni. Pacjenci tacy mogą być przeszczepieni w oparciu o ujemny vXM, a ostateczna próba krzyżowa może być wykonana retrospektywnie. Pacjenci uczuleni powinni mieć wykonaną prospektywną próbę krzyżową przy użyciu czulszej, niż CDC, techniki cytometrii przepływowej (FCXM). Potransplantacyjne monitorowanie przeciwciał wykonywane w regularnych odstępach czasowych, w czasie biopsji oraz przy podejrzanym odrzucaniu i w okresie obniżonej funkcji przeszczepu może być dla klinicysty kluczowe do podjęcia decyzji o modyfikacji leczenia.

## Literatura

- [1] Morath C., Opelz G., Zeier M., Susal C.: Kidney transplantation for high-risk sensitized patients – the “Heidelberg Algorithm”. *Transplant. Proc.*, 2011; 43: 801-804
- [2] Terasaki P.I.: A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation*, 2012; 93: 751-756
- [3] Fuggle S.V., Martin S.: Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*, 2008; 86: 384-390
- [4] Collaborative Transplant Study, University of Heidelberg, Germany, 2011, [www.ctstransplant.org](http://www.ctstransplant.org)

- [5] Susal C., Dohler B., Opelz G.: Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant Study report. *Hum.Immunol.* 2009; 70:569-573
- [6] Eincke G., Sis B., Reeve J. i wsp.: Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am.J.Transplant* 2009; 9: 2520-2531
- [7] Gebel H.M., Bray R.A., Nickerson P.: Pre-transplant assessment of donor-reactive HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs risk. *Am.J.Transplant.* 2003; 3: 1488-1500
- [8] Susal C., Morath C.: Current approaches to the management of highly sensitized kidney transplant patients. *Tissue Antigens*, 2011; 77: 177-186
- [9] Takemoto S., Cecka J.M., Gjertson D.W. i wsp.: Six –antigen-matched transplants: causes of failure. *Transplantation*, 1993; 55: 1005-1008
- [10] Eijsink C., Zoet Y.M., Kardol M.J. i wsp.: Identification of acceptable HLA mismatches in immunized patients using single-antigen-expressing cell lines.: *Tissue Antigens*, 2007; 69: 354-357
- [11] Monien S., Salama A., Schonemann C.: ELISA methods detect HLA antibodies with variable sensitivity.: *Int.J.Immunogenet*, 2006; 33: 163-166
- [12] Stastny P., Ring S., Lu C., Arenas J., Han M., Lavingia B.: Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum.Immunol.* 2009; 70: 600-604
- [13] Yabu J.M., Higgins J.P., Chen G. i wsp.: C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation*, 2011; 91: 342-347
- [14] Gebel H.M., Moussa O., Eckels D.D., Bray R.A.: Donor-reactive HLA antibodies in renal allograft recipients: considerations, complications, and conundrums. *Hum. Immunol.*, 2009; 70: 610-617
- [15] Duquesnoy R.J., Marrari M.: HLAMatchmaker-based definition of structural human leukocyte antigen epitopes detected by alloantibodies. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2009; 14: 403-409
- [16] Patel R., Terasaki P.I.: Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *NEJM* , 1969; 280:735-739
- [17] Garovoy M.R., Rheinschmidt M.A., Bigos M., Perkins H., Colombe B.: Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 1939-1944
- [18] VaidyaS., Partlow D., Susskind B., Noor M., Barnes T., Gugliuzza K.: Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation*, 2006; 82: 1524-1528
- [19] Kosmoliaptsis V., Bradley J.A., Peacock S., Chaudry A.N., Taylor C.J.: Detection of IgG HLA specific alloantibodies in renal transplant patients using single antigen beads is compromised by the presence of IgM HLA specific alloantibodies: characteristics and resolution. *Hum.Immunol.*, 2009; 87: 813-820
- [20] Cho Y.W., Cecka J.M.: Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991 – 2000. *Clinical Transplants*, 2001; 237-246
- [21] El Fettouh H.A., Cook D.J., Bishay E. i wsp.: Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology*, 2000; 56: 369-372

## 6. Identyfikacja przeciwciał anty-HLA ...

- [22] Taylor C.J., Kosmoliptsis V., Sharples L.D. i wsp.: Ten-year experience of selective omission of the pretransplant crossmatch test in deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*, 2010; 89: 185-193
- [23] Johnson R.J., Fuggle S.V., O'Neill J. i wsp.: Factors influencing outcome after deceased heart-beating donor kidney transplantation in UK: an evidence base for a new national kidney allocation policy. *Transplantation*, 2010; 89: 379-386
- [24] Taylor C.J., Smith S.I., Morgan C.H. i wsp.: Selective omission of the donor crossmatch before renal transplantation. *Transplantation*, 2000; 69: 719-723
- [25] Morales-Buenrostro L.E., Terasaki P.I., Marino-Vazquez L.A., Lee J.H., El-Awar N., Alber J.: "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonimmunized healthy males. *Transplantation*, 2008; 86: 1111-1115
- [26] Amico P., Honger G., Sterger J., Schaub S.: Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr.Opin.Organ.Transplant.*, 2008; 85: 1200-1204
- [27] Worthington J.E., Martin S.A., Al-Husseini D.M., Dyer P.A., Johnson R.W.G.: Post-transplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*, 2003; 75:1034-1040
- [28] Worthington J.E., McEwen A., McWilliam L.J., Picton M.L., Martin S.: Association between C4d staining in renal transplant biopsies, production of donor specific antibodies and graft outcome. *Transplantation*, 2007; 83: 298-403
- [29] Bohmig G.A., Exner M., Habicht A. i wsp.: Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J.A.Soc.Nephrol.* 2002; 13: 1091-1099
- [30] Burns J.M., Cornell L.D., Perry D.K. i wsp.: Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am.J.Transplant.* 2008; 8: 2684-2694
- [31] Roelen D.L., Doxiadis I.I.N., Claas F.H.J.: Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. *Transplant International*, 2012; 25: 604-610
- [32] Reinsmoen N.L., Lai C.H., Vo A. i wsp.: Acceptable donor-specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy. *Transplantation*, 2008; 86: 820-825
- [33] Morath C., Opelz G., Zeier M., Susal C.: Prevention of antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplant International*, 2012; 25:633-645
- [34] Fehr t., Rusi B., Fisher A., Hopfer H., Wuthrich R.P., Gaspert A.: Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation*, 2009; 87: 1837-1841
- [35] Stegall M.D., DiwanT., Raghavaiah S. i wsp.:Terminal Complement inhibition decreased antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am.J.Transplant*, 2011; 11:2405-2413
- [36] Higgins R., Hathaway M., Lowe D. i wsp.: Blood levels of donor-specific human leukocyte antigenantibodies after renal transplantation; resolution of rejection in the presence of circulating donor-specific antibody. *Transplantation*, 2007; 84: 876-884
- [37] Collaborative Publication, British Society for Histocompatibility & Immunogenetics, and British Transplantation Society, UK: Guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation, 2011, [www.bts.org.uk](http://www.bts.org.uk) & [www.bshi.org.uk](http://www.bshi.org.uk)

# CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA HLA DRB1\*03 I DRB1\*04 U POTENCJALNYCH BIORCÓW NEREK

Barbara Krasnodębska-Szponder, Katarzyna Galant, Izabela Czyżewska,  
Iwona Wojciechowska-Koszko, Stefania Giedryś-Kalemba

*Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii,  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie*

## Streszczenie

Celem niniejszej pracy była analiza częstości występowania dwóch wybranych specyficzności HLA klasy II – DRB1\*03 i DRB1\*04 u 250 pacjentów kwalifikowanych do przeszczepu nerki oraz porównanie częstości występowania tych antygenów z grupą kontrolną 300 osób zdrowych. Badaniem zostali objęci pacjenci Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 w Szczecinie, Oddziału Dializ Szpitala Wojewódzkiego w Szczecinie, stacji dializ z terenu województwa zachodniopomorskiego oraz zdrowi, niespokrewnieni, potencjalni dawcy szpiku kostnego. Typowanie DRB1\*03 i DRB1\*04 wykonano przy użyciu metody PCR-SSP. Stwierdzono częstsze występowanie DRB1\*03 w grupie osób oczekujących na transplantację nerki ( $p=0,005$ ) niż u osób zdrowych. DRB1\*03 występowało częściej u kobiet oczekujących na przeszczep niż u kobiet z grupy kontrolnej ( $p=0,004$ ).

DRB1\*04 występowało częściej u potencjalnych biorców nerek niż u osób zdrowych ( $p=0,0007$ ). Obecność DRB1\*04 obserwowano częściej u pacjentów płci męskiej niż osobników zdrowych tej samej płci ( $p=0,0001$ ). Uzyskane wyniki wskazują na częstsze występowanie DRB1\*03 oraz DRB1\*04 u osób oczekujących na transplantację nerki.

*Słowa kluczowe:* HLA-DRB1\*03, HLA-DRB1\*04, biorcy nerek

## 7.1. Wstęp

Białka głównego układu zgodności tkankowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*), określane u ludzi mianem HLA (ang. *human leucocyte antigens*) klasy I i II odpowiedzialne są za prezentację obcych antygenów limfocytom T i wytworzenie swoistej odpowiedzi immunologicznej. Same, jako silne, immunogenne antygeny odgrywają znaczącą rolę w doborze dawcy i biorcy przeszczepu

## 7. Częstość występowania HLA DRB1\*03 i DRB1\*04 ...

i decydują o jego odrzuceniu. Wykazano związki HLA, szczególnie klasy II, z różnymi chorobami, najczęściej o podłożu autoimmunologicznym [1]. Przykładami mogą być HLA DRB1\*03, DRB1\*04, DRB1\*11 czy DRB1\*15. HLA-DRB1\*03 oraz HLA-DRB1\*04 często związane są z chorobami autoimmunologicznymi, prowadzącymi do niewydolności nerek.

Posiadanie DRB1\*03 lub DRB1\*15 zwiększa ryzyko wystąpienia toczenia rumieniowatego układowego (SLE) [2]. U większości chorych z toczeniem układowym dochodzi do uszkodzenia nerek. W toczniowym zapaleniu nerek u 40-80% stwierdza się upośledzenie filtracji kłębuszkowej, a u około 10-25% chorych dochodzi do schyłkowej niewydolności nerek i konieczności transplantacji [3, 4]. Ryzyko zachorowania na cukrzycę typu I, która nadal stanowi ważną przyczynę schyłkowej niewydolności nerek, jest 25-krotnie wyższe dla osób z DRB1\*03. DRB1\*03 występuje u ok. 95% chorych na cukrzycę typu I rasy kaukaskiej [5].

Inne schorzenia, wykazujące genetyczną predyspozycję z występowaniem DRB1\*03/DRB1\*04 to autoimmunologiczne zapalenie wątroby [6] i młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów [7]. Z kolei badania Krasowskiej-Kwiecień i wsp. [8] wykonane u dzieci z Polski południowo-wschodniej wykazały asocjacje HLA DRB1\* z występowaniem idiopatycznego zespołu nerczycowego, m.in. DRB1\*03 związany był ze steroidozależnym zespołem nerczycowym, a DRB1\*04 z pierwotnie steroidoopornym.

Podłoże powiązań genetycznych antygenów HLA z licznymi chorobami nie jest wyjaśnione, niemniej badania w tym kierunku są wciąż prowadzone, bowiem mogą mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Celem pracy było porównanie częstości występowania DRB1\*03 i DRB1\*04 u pacjentów zakwalifikowanych do przeszczepienia nerki i u osób zdrowych.

## 7.2. Metodyka

**Pacjenci** Badaniem objęto 250 pacjentów zakwalifikowanych do przeszczepienia nerki w latach 2008-2011 w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Klinicznego nr 2 w Szczecinie, w Oddziale Dializ Szpitala Wojewódzkiego w Szczecinie oraz przez stacje dializ z terenu województwa zachodniopomorskiego. W grupie badanej znalazło się 112 kobiet (średnia wieku 43,4 lata) oraz 138 mężczyzn (średnia wieku 48,3 lata). Grupę kontrolną stanowiło 300 zdrowych, niespokrewnionych osób – potencjalnych dawców szpiku (132 kobiety i 168 mężczyzn).

**Metoda** Ludzkie genomowe DNA zostało wyizolowane z krwi obwodowej klasyczną metodą „salting out” przy użyciu zestawu Blood Mini Kit (A&A Biotechnology, Polska). Typowanie antygenów układu HLA wykonano z zastosowaniem metody PCR-SSP na poziomie niskiej rozdzielczości, przy użyciu zestawów „Ready Gene DRB1\* Low Resolution SSP Typing Kit” firmy Inno-Train Diagnostik, Germany.

Produkty amplifikacji zidentyfikowano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem 0.7  $\mu\text{g/ml}$  bromku etydyny. Do analizy statystycznej zastosowano test  $\chi^2$ , a w przypadku stwierdzenia wartości oczekiwanej mniejszej

od 10 lub 5 zastosowano odpowiednio test  $\chi^2$  z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera używając programu Statistica wersja 10.

### 7.3. Wyniki

Wśród 250 przebadanych osób, zakwalifikowanych do przeszczepienia nerki, DRB1\*03 stwierdzono u 51 osób (20,4%), DRB1\*04 u 54 osób (21,6%), obie specyficzności razem u 15 osób (6%). W grupie kontrolnej częstość ich występowania była istotnie niższa. DRB1\*03 wystąpiło u 35 osób (11,7%), a DRB1\*04 u 33 osób (11%). W grupie badanej DRB1\*03 oznaczono częściej u kobiet niż u mężczyzn (30,3% vs 12,3%,  $p=0,0004$ ), natomiast DRB1\*04 przeważało u mężczyzn niż u kobiet (24,6% vs 17,8%, ns). W grupie osób zdrowych, zarówno DRB1\*03 jak i DRB1\*04 występowały częściej u kobiet (odpowiednio 15,1% i 14,4%) niż u mężczyzn (odpowiednio 8,9% i 8,3%). Porównanie z kolei grup badanej i kontrolnej w zależności od płci wykazało, że DRB1\*03 wystąpiło częściej u pacjentek niż u kobiet z grupy kontrolnej (30,3% vs 15,1%,  $p=0,004$ ), natomiast DRB1\*04 wystąpiło częściej u pacjentów niż mężczyzn z grupy kontrolnej (24,6% vs 8,3%,  $p=0,0001$ ). Szczegółowe dane zamieszczono w Tabelach 7.1, 7.2, 7.3.

Dodatkowej analizie poddano haplotypy z obecnością DRB1\*03 lub DRB1\*04 występujące u osób z grupy oczekującej na przeszczepienie nerki i kontrolnej. Niektóre z nich występowały częściej lub rzadziej w grupie badanej niż w kontrolnej lub nie występowały w danej grupie. Najczęściej stwierdzono haplotyp A\*01 B\*08 DRB1\*03, który u osób z grupy badanej wystąpił istotnie statystycznie częściej niż w grupie kontrolnej (12,8% vs 6,0%,  $p=0,006$ ). Natomiast haplotyp

Tabela 7.1: Rozkład częstości występowania HLA-DRB1\*03 i DRB1\*04 u biorców nerek i w grupie kontrolnej.

HLA	Biorcy nerek N=250	Grupa kontrolna N=300	
	n (%)	n (%)	
DRB1*03	51 (20,4)	35 (11,7)	$p=0,005$
DRB1*04	54 (21,6)	33 (11,0)	$p=0,0007$
DRB1*03/DRB1*04	15 (6,0)	9 (3,0)	

Tabela 7.2: Rozkład częstości występowania HLA-DRB1\*03 i DRB1\*04 w analizowanych grupach kobiet.

HLA	Pacjentki N=112	Kobiety zdrowe N=132	
	n (%)	n (%)	
DRB1*03	34 (30,3)	20 (15,1)	$p=0,0004$
DRB1*04	20 (17,8)	19 (14,4)	
DRB1*03/DRB1*04	9 (8,0)	5 (3,8)	



## 7. Częstość występowania HLA DRB1\*03 i DRB1\*04 ...

Tabela 7.3: Rozkład częstości występowania HLA-DRB1\*03 i DRB1\*04 w analizowanych grupach mężczyzn.

HLA	Pacjenci N=138	Mężczyźni zdrowi N=168	
	n (%)	n (%)	
DRB1*03	17 (12,3)	15 (8,9)	p=0,0001
DRB1*04	34 (24,6)	14 (8,3)	
DRB1*03/DRB1*04	6 (4,3)	4 (2,4)	

Tabela 7.4: Wybrane haplotypy z obecnością HLA-DRB1\*03 występujące u biorców nerek i w grupie kontrolnej

Haplotyp	Biorcy nerek N=250	Grupa kontrolna N=300	
	n (%)	n (%)	
A*01 B*08 DRB1*03	32 (12,8)	18 (6,0)	p=0,0006
A*02 B*07 DRB1*03	6 (2,4)	4 (1,3)	
A*02 B*08 DRB1*03	8 (3,2)	10 (3,3)	
A*03 B*08 DRB1*03	5 (2,0)	3 (1,0)	
A*24 B*08 DRB1*03	5 (2,0)	3 (1,0)	
A*26 B*38 DRB1*03	3 (1,2)	-	

Tabela 7.5: Wybrane haplotypy z obecnością HLA-DRB1\*04 występujące u biorców nerek i w grupie kontrolnej

Haplotyp	Biorcy nerek n=250	Grupa kontrolna n=300	
	n (%)	n (%)	
A*02 B*35 DRB1*04	11 (4,4)	5 (1,7)	
A*02 B*27 DRB1*04	8 (3,2)	3 (1,0)	
A*02 B*44 DRB1*04	6 (2,4)	7 (2,3)	
A*03 B*44 DRB1*04	5 (2,0)	4 (1,3)	
A*25 B*18 DRB1*04	5 (2,0)	7 (2,3)	
A*30 B*13 DRB1*04	4 (1,6)	-	

A\*26 B\*38 DRB1\*03 wykryty tylko u 3 (1,2%) osób z grupy badanej, nie występował w grupie kontrolnej.

Najczęściej występującym haplotypem z obecnością DRB1\*04 u osób z grupy badanej był haplotyp A\*02 B\*35 DRB1\*04 (4,4%) oraz A\*02 B\*27 DRB1\*04 (3,2%), które w grupie badanej obserwowano częściej niż w grupie kontrolnej (odpowiednio 1,7% i 1%), niemniej nie były to różnice istotne statystycznie, natomiast haplotyp A\*30 B\*13 DRB1\*04 stwierdzono jedynie u osób z grupy badanej (7,5%). Rozkład wybranych haplotypów z DRB1\*03 i DRB1\*04 w analizowanych grupach przedstawiono w Tabeli 7.4 i 7.5.

## 7.4. Podsumowanie

Częstość występowania specyficzności HLA, w tym HLA *locus* DRB1\*, została poddana szczegółowej analizie przez wielu badaczy na całym świecie. Badania dotyczyły różnych populacji osób zdrowych [9–11], a także asocjacji poszczególnych antygenów z różnymi schorzeniami, które m.in. mogą prowadzić do niewydolności nerek. Pojedyncze są jednak doniesienia na temat występowania HLA DRB1\* u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek zakwalifikowanych do transplantacji nerki.

W badaniach własnych stwierdzono istotnie statystycznie częstsze występowanie zarówno DRB1\*03 jak i DRB1\*04 u pacjentów oczekujących na przeszczepienie nerki w porównaniu z grupą kontrolną (ok. 21% vs ok. 12%). DRB1\*03 występowało częściej u pacjentek niż pacjentów (30,3% vs 12,3%), oraz częściej u pacjentek niż kobiet z grupy kontrolnej (30,3% vs 15,1%). Natomiast DRB1\*04 wykryto częściej u pacjentów niż mężczyzn z grupy kontrolnej (24,6% vs 8,3%).

W większości prac częstość występowania zarówno DRB1\*03 jak i DRB1\*04 w grupach osób zdrowych jest podobna do wyników uzyskanych w naszych badaniach. W pracy dotyczącej marokańskiej populacji osób zdrowych DRB1\*03 występowało w 13,9%, DRB1\*04 w 16% [12], natomiast w populacji hiszpańskiej jest to odpowiednio 14,2% i 15,1% [13]. Wyniki zbieżne z uzyskanymi przez nas otrzymał Karahan i wsp. [14], którzy przebadali grupę 587 pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek i stwierdzili istotnie częstsze występowanie DRB1\*03 w porównaniu z grupą kontrolną 2643 zdrowych osób (24% vs 18%,  $p=0,0008$ ), niemniej nie analizowano występowania tych specyficzności w zależności od płci. Z kolei badacze z Kuwejtu, Al.-Eisa i wsp. [15] stwierdzili częste występowanie DRB1\*03 zarówno w grupie 61 dzieci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, jak i w grupie kontrolnej (odpowiednio 25% i 26%).

Odmienne wyniki przedstawili Fu i wsp. [16] badający grupę 1383 pacjentów oczekujących na przeszczep nerki w latach 2001-2010 w Chinach. Spośród HLA-DRB1\* najczęściej występującymi były DRB1\*09, DRB1\*12 oraz DRB1\*15. Natomiast HLA DRB1\*03 i DRB1\*04, które w naszych badaniach wykryto istotnie częściej u osób oczekujących na przeszczep, występowały w niewielkim odsetku (odpowiednio 4,5% oraz 4,2%). Można to tłumaczyć innym rozkładem antygenów HLA w populacji rasy żółtej i rasy kaukaskiej.

W badaniach własnych porównano rozkład haplotypów z udziałem DRB1\*03 lub DRB1\*04 w grupie badanej i kontrolnej. Najczęściej występującym haplotypem z obecnością DRB1\*03 był haplotyp A\*01 B\*08 DRB1\*03, który dwukrotnie częściej wystąpił w grupie badanej niż w kontrolnej (12,8% vs 6,0%,  $p=0,006$ ). Jest to najczęściej występujący haplotyp u osób rasy kaukaskiej [17, 18]. Haplotypy A\*02 B\*35 DRB1\*04 oraz A\*02 B\*27 DRB1\*04 wystąpiły także częściej w grupie badanej niż kontrolnej, jednak nie są to różnice znamienne statystycznie. Haplotypy A\*26 B\*38 DRB1\*03 oraz A\*30 B\*13 DRB1\*04 wykryto tylko u osób oczekujących na transplantację nerki.

Wyniki badań własnych wykonane u osób rasy kaukaskiej zamieszkujących region Pomorza Zachodniego, u których występuje niewydolność nerek, często na podłożu autoimmunologicznym, wykazały u nich częstsze występowanie

## 7. Częstość występowania HLA DRB1\*03 i DRB1\*04 ...

DRB1\*03 oraz DRB1\*04, a także haplotyp A\*01 B\*08 DRB1\*03 niż u osób zdrowych. Problem ten wymaga dalszych badań, szczególnie w kontekście uwzględnienia przyczyny schyłkowej niewydolności nerek osób oczekujących na przeszczep, jak również analizy większej liczby osób.

## Literatura

- [1] Cruz-Tapias P, Pérez-Fernández O.M., Rojas-Villarraga A., Rodríguez-Rodríguez A., Arango M.T., Anaya J.M.: Shared HLA class II in six autoimmune disease in Latin America: a meta-analysis. *Autoimmune Dis.* 2012; 569728
- [2] Vasconcelos C., Carvalho C., Leal B. i wsp.: HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features. *Ann. N Y Acad.Sci* 2009; 1173: 575-580
- [3] MacGowan J.R., Ellis S., Griffiths M., Isenberg D.A.: Retrospective analysis of outcome in a cohort of patients with lupus nephritis treated between 1977 and 1999. *Rheumatology* 2002; 41: 981-987
- [4] Martins L., Rocha G., Rodriguez A. i wsp.: Lupus nephritis: a retrospective review of 78 cases from a single center. *Clin Nephrol.* 2002; 57 (2): 114-119
- [5] Mehers K.L., Gillespie K.M.: The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* 2008; 88 (1): 115-129
- [6] Kuczyńska R., Sielużycka A., Szaflarka-Popławska A.: Autoimmunologiczne zapalenie wątroby. *Przegl. Ped.* 2007; 37 (4): 389-392
- [7] Musiej-Nowakowska E., Mączyńska-Rusiniak B.: HLA klasy I i II u chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów o uogólnionym początku choroby. *Reumatologia* 2008; 46 (5): 266-271
- [8] Krasowska-Kwiecień A, Sancewicz-Pach K, Moczulska A.: Idiopathic nephrotic syndrome in Polish children - its variants and associations with HLA. *Pediatr. Nephrol.* 2006; 21 (12): 1837-1846
- [9] Rendine S., Ferrero N.M., Sacchi N., Costa C., Pollichieni S., Amoroso A.: Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Hum. Immunol.* 2012; 73 (4): 399-404
- [10] Paximadis M., Mathebula T.Y., Gentle N.L. i wsp.: Human leukocyte antigen class I (A,B,C) and II (DRB1) diversity in the black and Caucasian South African population. *Hum. Immunol.* 2012; 73 (1): 80-92
- [11] Trachtenberg E., Vinson M., Hayes E. i wsp.: HLA class I (A,B,C) and II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in Han southern China. *Tissue Antigens* 2007; 70 (6): 455-463
- [12] Kabbaj M., Oudghiri M., Naya A., Naamane H., Bennani S.: Polymorphism of human leukocyte antigen A, B and DRB1 in Moroccan population from Casablanca: study of the allelic and haplotypic frequencies. *Ann. Biol. Clin.* 2011; 69(3):295-301
- [13] Alcoceba M., Marin L., Balanzategui A. i wsp.: Frequency of HLA-A, B and DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y Leon (northwest – central Spain). *Tissue Antigens* 2011; 78 (4): 249-255
- [14] Karahan G.E., Seyhun Y., Oguz F.S.: i wsp.: Impact of HLA on the underlying primary disease in Turkish patients with end-stage renal disease. *Ren. Fail.* 2009; 31 (1): 44-49

- [15] Al-Eisa A.A., Haider M.Z., Srivasta B.S.: HLA-DRB1 alleles in Kuwaiti children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2000 15 (1-2): 79-81
- [16] Fu Q., Wang C., Zeng W., Liu L.: The correlation of HLA allele frequencies and HLA antibodies in sensitized kidney transplantation candidates. *Transplant. Proc.* 2012; 44 (1): 217-221
- [17] Mack S.J., Tu B., Yang R., Masaberg C., Ng J., Hurley C.K.: Human leukocyte antigen A, B, C, DRB1 allele and haplotype frequencies in Americans originating from southern Europe: contrasting patterns of population differentiation between Italian and Spanish Americans. *Hum. Immunol.* 2011; 72 (2): 144-149
- [18] Bortolotto A.S., Petry M.G., da Silveira J.G. i wsp.: HLA-A, B and DRB1 allelic and haplotypic diversity in a sample of bone marrow volunteer donors from Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hum. Immunol.* 2012; 73 (2): 180-185

# PRÓBA KRZYŻOWA ANALIZOWANA METODĄ CYTOMETRII PRZEPIYWOWEJ

Barbara Piątosza

*Pracownia Zgodności Tkankowej,  
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”*

## Streszczenie

Próba krzyżowa analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (FCXM) jest wielokrotnie bardziej czuła od testu limfocytotoksycznego, uznawanego za podstawową metodę wykrywania immunizacji antygenami potencjalnego dawcy narządu. Metoda ta umożliwia określenie komórek docelowych oraz klasy immunoglobulin wykrywanych przeciwciał. Przestrzeganie pewnych zasad wykonania FCXM jest niezbędne dla uzyskiwania wiarygodnych klinicznie wyników.

*Słowa kluczowe:* próba krzyżowa, cytometria przepływowa, przeszczepy narządów unaczynionych

## 8.1. Wstęp

Od kiedy w 1969 roku Patel i Terasaki udokumentowali związek pomiędzy obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom zgodności tkankowej a utratą czynności nerki przeszczepionej, przed wykonaniem przeszczepu obowiązkowe jest badanie w kierunku obecności przeciwciał w surowicy potencjalnego biorcy alloprzeszczepu nerki. Przeciwciała te mogą powstawać w wyniku immunizacji komórkami o innych niż własne antygenach powierzchniowych np. w czasie ciąży, w wyniku przetoczeń krwi i/lub w następstwie immunizacji antygenami poprzedniego przeszczepu. Mogą one należeć do różnych klas immunoglobulin (IgG, IgM lub IgA), mieć zdolność aktywacji dopełniacza (IgG1, IgG2, IgG3, IgM), a ich swoistość może odpowiadać immunizacji antygenami zgodności tkankowej (HLA) I i/lub II klasy lub innym antygenom obecnym na powierzchni komórek immunizujących. Wykrycie w surowicy potencjalnego biorcy obecności przeciwciał mających zdolność wiązania dopełniacza (tzw. limfocytotoksycznych), skierowanych przeciwko antygenom dawcy, uważane jest za bezwzględnie przeciwwskazanie do przeszczepienia nerki.

Ograniczona czułość i subiektywność oceny nasilenia reakcji limfocytotoksyczności zależnej od dopełniacza oraz wątpliwości dotyczące znaczenia klinicznego przeciwciał niemających właściwości cytotoksycznych, doprowadziły do

rozwoju różnych innych technik nieobarczonych wadami testu limfocytotoksycznego a umożliwiających ocenę immunizacji biorcy przeszczepu. Jedną z nich jest próba krzyżowa wykorzystująca cytometrię przepływową do pomiaru nasilenia reakcji pomiędzy antygenami dawcy a przeciwciałami obecnymi w surowicy krwi biorcy (ang. *flow cytometric crossmatch*, FCXM). Miarą reakcji jest świecenie komórek wiążących znakowane fluorochromem przeciwciało (koniugat) skierowane przeciwko przeciwciału pochodzącemu z surowicy pacjenta, związanemu z antygenem na powierzchni komórki docelowej. Nasilenie świecenia jest proporcjonalne do ilości związanego przeciwciała znakowanego fluorochromem. Technika ta umożliwia też rozróżnienie komórek docelowych oraz określenie klasy immunoglobulin wykrytych przeciwciał [1, 2]. Uważa się, że technika ta ma największą czułość spośród wykorzystujących komórki dawcy jako nośnika antygenów dawcy. Dane pochodzące z wielu laboratoriów wykazały użyteczność kliniczną FCXM w przewidywaniu wczesnej utraty czynności narządu i zwiększonej częstości epizodów odrzucania. Oponenty wskazują jednak, że zwiększona czułość będąca największą zaletą - jest również największą wadą metody.

Ze względu na ogromną liczbę parametrów mających wpływ na wynik badania i jego interpretację Amerykańskie Towarzystwo Immunogenetyczne (ang. *American Society of Histocompatibility and Immunogenetics*, ASHI) oraz Europejska Federacja Immunogenetyki (ang. *European Federation for Immunogenetics*, EFI) opracowały podstawowe wskazówki, którymi należy się kierować przy wykonywaniu FCXM. Wskazówki te nie stanowią gotowych instrukcji wykonania badania, lecz przyczyniają się do zwiększenia wiarygodności uzyskanych wyników. W niniejszym opracowaniu przedstawione zostaną zalecenia metodyczne oraz podstawy teoretyczne stanowiące uzasadnienie dla ich stosowania.

## 8.2. Rodzaj komórek docelowych

W FCXM są wykorzystywane izolowane w gradiencie gęstości limfocyty pochodzące z krwi obwodowej, węzłów chłonnych lub śledziony potencjalnego dawcy. Mogą one być wykorzystane w badaniu bezpośrednio po izolacji lub przechowane w temperaturze około 4°C do następnego dnia, w medium zapewniającym zachowanie żywotności komórek (np. podłożu Hanksa, RPMI 1640 lub buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS)) [2]. Przed użyciem w FCXM komórki muszą zostać wielokrotnie wypłukane w celu usunięcia nieswoiście związanych z powierzchnią komórek immunoglobulin obecnych w surowicy krwi pacjenta [3].

## 8.3. Płyny i bufory

Choć przeciwciała skierowane przeciwko antygenom HLA stanowią niewielką część wszystkich immunoglobulin surowicy, nawet u pacjentów z ich wysokimi mianami, zaleca się by procedura płukania komórek przed rozpoczęciem barwienia była powtórzona co najmniej trzy razy. Wskazane jest by w buforze znajdował się dodatek 0,01% - 0,1% azydku sodowego przeciwdziałającego internalizacji

antygenów z powierzchni komórek oraz 1 - 2% białka (surowicy płodowej cielęcej lub albuminy) zmniejszającego nieswoistą fluorescencję. Bufor powinien być przygotowywany bezpośrednio przed badaniem i przed użyciem schłodzony do temperatury około 4°C [2, 3]. Wielokrotne płukanie przed każdym etapem procedury służy poprawieniu czułości testu [4].

#### **8.4. Surowice kontrolne i surowica badana**

W każdym badaniu immunologicznym, także w FCXM, konieczne jest stosowanie kontroli ujemnej i dodatniej. Do oceny poprawności przeprowadzonej reakcji służy surowica kontrolna dodatnia, pochodząca od dawców wysoko immunizowanych, o wysokim mianie przeciwciał anti-HLA. Przed użyciem w badaniu diagnostycznym należy surowicę tę zmiareczkować, tzn. określić rozcieńczenie umożliwiające uzyskanie około dwa razy większej intensywności fluorescencji, niż w reakcji uważanej za ujemną. Surowicę kontrolną ujemną, niezawierającą przeciwciał anti-HLA, stanowi zazwyczaj surowica ludzka dawców grupy AB. Brak przeciwciał w takiej surowicy musi być potwierdzony w badaniu z wykorzystaniem limfocytów od co najmniej 10 dawców, o znanych fenotypach antygenów zgodności tkankowej, obejmujących większość występujących w populacji swoistości HLA. Tylko surowice niewykazujące reaktywności w takich warunkach mogą zostać użyte jako surowica kontrolna ujemna [2].

Miarą reakcji jest różnica pomiędzy fluorescencją komórek, które związały przeciwciała obecne w surowicy badanej, a fluorescencją komórek inkubowanych z surowicą kontrolną ujemną. Ilość antygenów wiążących przeciwciała na powierzchni komórki jest cechą zmienną i zależy od rodzaju komórek, miejsca ich pochodzenia, czasu przechowywania materiału od pobrania do wykonania badania, oraz sposobu postępowania z komórkami przed użyciem w FCXM. Z tego powodu w każdym badaniu musi zostać wykonana próba z surowicą kontrolną ujemną, pozwalająca interpretować wynik z surowicą badaną w kontekście konkretnych warunków testu.

Zarówno surowica badana jak i surowice kontrolne, muszą przed badaniem zostać zainaktywowane w temperaturze 56°C przez 30 minut lub w co najmniej jednym cyklu zamrażania/rozmarzania surowicy. Surowicę taką należy następnie odwirować w celu usunięcia agregatów immunoglobulin, które mogą być przyczyną nieswoistej fluorescencji. Na takie wiązanie nieswoiste, a tym samym reakcje fałszywie dodatnie, podatne są szczególnie limfocyty B posiadające na swej powierzchni receptory Fc [2].

Surowica badana musi być używana w teście zawsze w postaci natywnej, w przeciwieństwie do surowicy kontrolnej dodatniej, które używana jest w rozcieńczeniu odpowiednim do wyników miareczkowania [2].

#### **8.5. Inkubacja komórek docelowych z surowicą**

Bardzo istotnym etapem FCXM jest inkubacja komórek docelowych z surowicą badaną. Do czasu użycia w badaniu wielokrotnie wypłukane i zawie-

szone w buforze płuczącym komórki muszą być przechowywane w temperaturze 4°C. W warunkach tych ograniczone jest zjawisko złuszczenia antygenów z powierzchni limfocytów. Zdolność wykrywania przeciwciał w surowicy za pomocą cytometrii przepływowej zależy od ilości przeciwciał obecnych w surowicy badanej i liczby cząstek antygenów docelowych na badanych komórkach. W mieszaninie inkubacyjnej powinno znajdować się pomiędzy  $1 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^5$  komórek i około 20 - 50  $\mu\text{l}$  surowicy badanej. Gęstość badanej zawiesiny komórkowej nie ma zasadniczego znaczenia. Zmiana jednak proporcji pomiędzy komórkami a surowicą niekorzystnie wpływa na czułość testu, dlatego po opracowaniu protokołu należy go ściśle przestrzegać [2, 3].

Wybór warunków inkubacji komórek z surowicą jest skutkiem kompromisu pomiędzy właściwościami badanych przeciwciał, a zachowaniem komórek. W niskiej temperaturze antygeny na powierzchni komórki są bardziej stabilne i chętniej wiążą immunoglobuliny klasy IgM. Temperatury powyżej 22°C sprzyjają wiązaniu immunoglobulin klasy IgG. Dla zachowania optymalnych warunków wiązania przeciwciał inkubację komórek z surowicą należy przeprowadzać w temperaturze około 22°C. Stabilność ekspresji antygenów na powierzchni komórek uzyskiwana jest w tych warunkach poprzez dodanie azydki sodowego do buforu, w którym zawieszono komórki. Inkubacja komórek z surowicą trwa zazwyczaj 15 do 30 minut, a po jej zakończeniu konieczne jest obfite, co najmniej dwukrotne, płukanie zawiesiny badanych limfocytów [3, 5].

## 8.6. Określenie klasy związanych przeciwciał

Wykrycie immunoglobulin związanych z badanymi limfocytami odbywa się za pomocą przeciwciała skierowanego przeciwko immunoglobulinom ludzkim, sprzęgniętego z odpowiednim fluorochromem (koniugatu). Odczynnik ten musi mieć dobrze zdefiniowaną swoistość, wykazywać możliwie najmniejszą fluorescencję nieswoistą, a w przypadku wykonywania badania z wykorzystaniem wielu kolorów - nie wykazywać reaktywności krzyżowej z przeciwciałami służącymi do znakowania komórek [2]. Najlepiej spełniają te warunki przeciwciała mające postać fragmentu F(ab')<sub>2</sub> lub Fab immunoglobulin, o swoistości skierowanej przeciwko fragmentowi Fc immunoglobuliny ludzkiej. Wybór takiego przeciwciała antyglobulinowego umożliwi ograniczenie jego nieswoistego wiązania do receptorów Fc obecnych na komórkach docelowych lub immunoglobulin powierzchniowych limfocytów B [3]. Dla uzyskania optymalnego sygnału fluorescencji koniugat używany jest zazwyczaj w rozcieńczeniu 1:4 - 1:20. W zależności od swoistości koniugatu możliwa jest identyfikacja związanych z komórką przeciwciał klasy IgG, IgM lub IgA.

Trwająca zazwyczaj 30 minut inkubacja z koniugatem prowadzona jest w temperaturze 4°C, dzięki czemu kompleks antygen-przeciwciało-koniugat na powierzchni błony komórkowej jest bardziej stabilny. Po inkubacji komórki należy ponownie wypłukać co najmniej 2 razy, aby usunąć nadmiar odczynnika niezwiązanego z powstałym na komórce kompleksem antygen (dawcy) - przeciwciało (biorcy). Kompromis pomiędzy usuwaniem niezwiązanych przeciwciał przez



ich rozcieńczenie, a odszczepianiem przeciwciał związanych swoiście w wyniku zmian w równowadze stężeń osiągnany jest dzięki dodaniu białka (np. albuminy) do podłoża płuczącego [3].

## 8.7. Identyfikacja komórek docelowych

Ogromną zaletą cytometrii przepływowej jest brak konieczności fizycznego rozdzielania populacji limfocytów T i B, przy zachowaniu precyzyjnej identyfikacji komórek docelowych wiążących przeciwciała. Wiadomo, że przeciwciała skierowane przeciwko antygenom HLA klasy I reagują z limfocytami T i B, a przeciwciała klasy II reagują z limfocytami B i monocytami [6]. Zazwyczaj do identyfikacji limfocytów T stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko molekułom CD3. Nie zaleca się wykorzystywania przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom CD4 ani CD8, gdyż nie identyfikują one jednoznacznie limfocytów T. Do identyfikacji limfocytów B wybierane jest zazwyczaj przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko molekułom CD19 lub CD20 [2].

Zasadniczo możliwe jest przeprowadzenie znakowania komórek docelowych w dowolnym momencie, jednak zrobienie tego na ostatnim etapie badania ma dodatkową zaletę, jaką jest unikanie potencjalnych interferencji przeciwciał monoklonalnych używanych do znakowania komórek z przeciwciałami używanymi na poprzednich etapach.

## 8.8. Wybór fluorochromów

Ze względu na optymalny dobór ilości badanych komórek i surowic oraz użytych odczynników i materiałów zużywalnych zaleca się przeprowadzanie badania próby krzyżowej w technice trykolorowej. (Dopuszcza się możliwość wykonywania badania z wykorzystaniem mniejszej liczby kolorów, lecz w takim przypadku musi zostać udokumentowana natura komórek docelowych). Ze względu na stereochemię reakcji, koniugat powinien być sprzęgnięty z fluoresceiną (FITC), a przeciwciała monoklonalne znakujące komórkę docelową - z fikoerytryną (PE) lub barwnikiem będącym kompleksem białkowym chlorofilu i perydyniny (PerCP). W teście z wykorzystaniem trzech kolorów fluorescencji najjaśniejszy fluorochrom jakim jest fikoerytryna powinien być wykorzystany do znakowania komórek o najmniejszej gęstości antygeny powierzchniowego, czyli limfocytów B, a kompleks chlorofilu i perydyniny do znakowania limfocytów T [7]. Dla uniknięcia wzajemnych interakcji, tłumienia reakcji lub tworzenia koniugatów, korzystne jest też odpłukanie nadmiaru koniugatu przed dodaniem przeciwciał znakujących limfocyty [3].

Wszystkie wykorzystane w badaniu przeciwciała monoklonalne muszą mieć jakość weryfikowaną i udokumentowaną przez producenta i/lub w lokalnej kontroli jakości. Muszą też być przechowywane zgodnie z zaleceniami producenta, aby zapewnić ich optymalną aktywność. Dla zapobiegnięcia obecności mikroagregatów w produktach komercyjnych, przeciwciała dostarczone przez producenta w postaci liofilizatów przechowywanych w temperaturze 4°C, należy od-

wirować po rekonstytucji zgodnie z instrukcją producenta lub odpowiednio do procedur obowiązujących w danym laboratorium.

## 8.9. Akwizycja

Cytometria przepływowa umożliwia badanie dużej liczby komórek i analizę precyzyjnie określonych populacji badanych komórek, bez konieczności ich fizycznego rozdzielania. Ocena fluorescencji osobno na populacji limfocytów T i B jest istotna ze względu na odmienny poziom fluorescencji, będącej wynikiem zarówno różnej autofluorescencji, jak i zdolności wiązania przeciwciał z surowicy badanej. Należy zadbać o uniknięcie domieszki komórek NK w zawieszynie limfocytów badanych, które mogą być źródłem wysokiej fluorescencji nieswoistej. Taka nieswoista fluorescencja spowodowana jest obecnością molekuly CD16, będącej receptorem Fc dla IgG [2].

Z praktycznego punktu widzenia przy akwizycji ustawiana jest najpierw bramka komórek limfoidalnych o małej wielkości i ziarnistości, a w jej obrębie wyznaczane są bramki limfocytów T i B, znakowanych odpowiednio przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD19 albo CD20. Dla uzyskania wiarygodnej oceny fluorescencji należy zbierać co najmniej 500 limfocytów z bramki o mniejszej liczebności komórek, zazwyczaj limfocytów B. Zapamiętywać należy jednak wszystkie dane, bo choć jest to bardziej czasochłonne i zajmuje więcej miejsca w pamięci komputera, to może się okazać bezpieczniejsze z punktu widzenia późniejszej analizy.

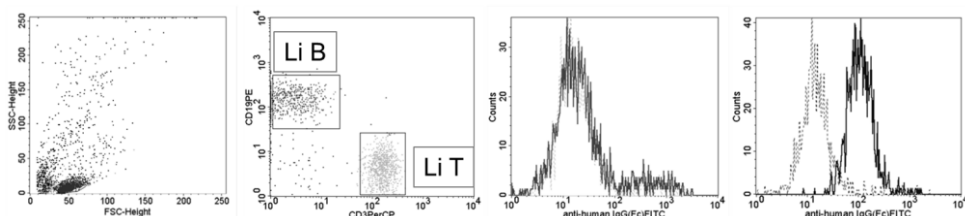
## 8.10. Analiza i interpretacja

Miarą reakcji jest zmiana fluorescencji komórek docelowych po inkubacji z surowicą badaną w porównaniu do komórek, które nie związały przeciwciał w trakcie inkubacji z surowicą kontrolną ujemną. Wobec braku standaryzacji metody, każde laboratorium musi ustalić własną wartość progową odróżniającą wynik ujemny od dodatniego. W każdym przypadku też badanie dla surowic kontrolnych i surowicy badanej należy wykonywać równocześnie, a akwizycję prowadzić przy tych samych ustawieniach instrumentu. Wskazane jest wykonywanie badania w dwóch powtórzeniach i wyliczenie średniej fluorescencji dla każdej badanej populacji.

Odpowiednio do sposobu pomiaru fluorescencji wynik może zostać przedstawiony jako różnica kanałów fluorescencji pomiędzy wykazywaną przez komórki inkubowane z surowicą badaną a komórkami inkubowanymi z surowicą kontrolną ujemną (fluorescencja liniowa), albo też jako wzrost mediany fluorescencji mierzonej w skali logarytmicznej na komórkach inkubowanych z surowicą badaną w porównaniu do inkubowanych z surowicą kontrolną ujemną (względna mediana fluorescencji - RMF). Stosując różne sposoby oceny reakcji, zgodne wyniki uzyskano przy ustaleniu wartości progowej na przesunięcie fluorescencji o więcej niż 20 kanałów, wzrost fluorescencji o więcej niż 566 ekwiwalentów rozpuszczalnej fluoresceiny lub wzrost mediany fluorescencji o więcej niż 50%,

czyli względną medianę fluorescencji (RMF) wynoszącą więcej niż 1,5 [4]. Wobec korzystniejszej oceny rozkładu fluorescencji za pomocą mediany wydaje się, że RMF najlepiej odpowiada zadaniu oceny nasilenia reakcji w próbie krzyżowej [2, 4]. Trzeba jednak pamiętać, że wobec różnej reaktywności komórek w zależności od ich rodzaju i miejsca pochodzenia właściwe może okazać się stosowanie różnych wartości granicznych dla limfocytów T i B, a także komórek pochodzących z krwi obwodowej i węzłów chłonnych [7]. Na podstawie dostępnych publikacji i własnego doświadczenia autorki wydaje się, że można polecić stosowanie wartości granicznej RMF 1,5 dla limfocytów izolowanych z krwi obwodowej lub węzłów chłonnych oraz RMF 2,0 jako wartości granicznej dla limfocytów pochodzących ze śledziony (Rycina 8.1).

Reakcja dodatnia z limfocytami T i B wskazuje na obecność przeciwciał anty-HLA klasy I, reakcja tylko z komórkami B wskazuje na obecność przeciwciał anty-HLA klasy II lub bardzo słabych przeciwciał anty-HLA klasy I, trudnych do odróżnienia w testach cytotoksycznych, ale prawdopodobnie mających znaczenie kliniczne [6].



Rycina 8.1: Strategia analizy próby krzyżowej w cytometrii przepływowej. Od lewej: Bramka limfocytów definiowana jest na podstawie wielkości (ang. *forward scatter*, FS) i ziarnistości (ang. *side scatter*) badanych komórek. Limfocyty T (oznaczone jako Li T) i B (Li B) rozdzielane są elektronicznie na podstawie znakowania za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko CD3 (limfocyty T) i CD19 lub CD20 (limfocyty B) (drugi z lewej). Miarą reakcji jest różnica pomiędzy fluorescencją wykazywaną przez limfocyty dawcy inkubowane z surowicą biorcy i fluorescencją limfocytów inkubowanych z surowicą kontrolną ujemną. Trzeci z lewej – reakcja ujemna, pierwszy z prawej – reakcja dodatnia. Linia przerywaną oznaczona fluorescencja komórek inkubowanych z surowicą kontrolną ujemną, linią ciągłą – fluorescencja komórek inkubowanych z surowicą badaną.

## 8.11. Wady i zalety

FCXM ma szereg zalet: umożliwia wykrywanie przeciwciał zarówno wiążących jak i niewiążących dopełniacz, pozwala określić klasę wykrywanych przeciwciał i nie wymaga fizycznego rozdzielania populacji limfocytów badanych dzięki zastąpieniu ich fizycznego rozdzielenia przez bramkowanie elektroniczne. Wobec różnic w rodzaju i liczbie antygenów HLA klasy I i II na badanych komórkach docelowych technika ta pozwala, z pewnym przybliżeniem, określać rodzaj wykrywanych przeciwciał (skierowanych przeciwko antygenom klasy I i/lub

II) [1,3]. Liczbowy pomiar fluorescencji zwiększa obiektywizm interpretacji w porównaniu do półilościowej oceny stosowanej w teście mikrolimfocytotoksycznym.

Wykorzystanie trzech kolorów fluorescencji pozwala na zmniejszenie liczby limfocytów o połowę w stosunku do badania z wykorzystaniem mniejszej liczby fluorescencji. Jest to szczególnie istotne przy badaniu komórek pochodzących z krwi obwodowej, w której limfocyty B stanowią zaledwie 10-15%. Wykazano, że badanie trzykolorowe jest też około 30% tańsze od dwukolorowego, wobec mniejszego zużycia odczynników, a jego analiza trwa około 25% krócej niż przy barwieniu z wykorzystaniem dwóch kolorów [7].

Według różnych autorów badanie cytometryczne jest 30 - 250 razy bardziej czułe od testu cytotoksycznego, co może stanowić wyjaśnienie dlaczego 18 - 25% pacjentów z ujemnym wynikiem próby krzyżowej z użyciem dopełniacza ma dodatni wynik FCXM [8].

Wysoka czułość może być też wadą. Badanie nie ma charakteru czynnościowego i może wykrywać przeciwciała swoiste dla dawcy narządu, lecz niepowodujące skutków patologicznych dla przeszczepionego narządu. Fałszywie dodatnie wyniki mogą być spowodowane m.in. wysoką autofluorescencją (co dotyczy szczególnie limfocytów B), obecnością autoprzeciwciał, przeciwciał swoistych dla antygenów innych niż HLA lub nieswoistym wiązaniem przeciwciała skoniugatowanego z fluoresceiną do receptorów Fc [3]. Jedną z głównych wad metody jest jednak brak standaryzacji, szczególnie w sposobie definiowania reakcji dodatniej i ujemnej. Określenie poziomu fluorescencji reprezentującej reakcję dodatnią jest subiektywne i różni się pomiędzy laboratoriami. Każdy zatem ośrodek musi opracować strategię interpretacji by zredukować odsetek reakcji fałszywie dodatnich.

## 8.12. Znaczenie kliniczne

Pomimo coraz bardziej nowoczesnej immunosupresji odrzucanie przeszczepionego narządu pozostaje ważnym problemem w transplantologii. Na powierzchni komórek obecne są antygeny zgodności tkankowej kodowane przez najbardziej polimorficzny układ genów w ludzkim organizmie, jakim jest główny kompleks zgodności tkankowej, ale także liczne inne białka o właściwościach antygenowych. Znaczenie przeciwciał produkowanych w odpowiedzi na immunizację tymi antygenami pozostaje często nieznanne. Wyniki badań obejmujące wiele tysięcy przeszczepionych nerek wskazują, że pozytywny wynik próby krzyżowej z co najmniej jednym rodzajem komórki docelowej (limfocyty T i/lub B) wiąże się z większą częstością epizodów odrzucania w ciągu pierwszego roku po przeszczepieniu [9-11] i gorszym przeżyciem przeszczepu w porównaniu do pacjentów, u których nie stwierdzono obecności przeciwciał swoistych dla dawcy [6, 12, 13]. Z tego względu w wielu ośrodkach uważa się, że metoda nadaje się do przewidywania długotrwałego przeżycia alloprzeszczepu i odpowiedniego modyfikowania stosowanej immunosupresji.

Wydaje się, że szczególne znaczenie może mieć klasa wykrywanych przeciwciał. W przeważającej liczbie laboratoriów wykonuje się badania służące wykryciu przeciwciał klasy IgG. Poglądy na temat znaczenia klinicznego przeciwciał innych klas są bardzo rozbieżne. Przeciwciałom klasy IgM przypisywano znaczenie korzystne [14] lub wręcz przeciwnie – negatywny wpływ na czynność i przeżycie przeszczepionej nerki [12]. Należy pamiętać, że przeciwciała klasy IgM są bardzo heterogenne: mogą być naturalne, lub też powstawać we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej po kontakcie z obcym antygenem - w obu przypadkach wykazują zdolność do wiązania antygenów i dopełniacza [15]. Ostatnio coraz częściej uważa się, obecność przeciwciał klasy IgM może stanowić czynnik ryzyka dla czynności nerki przeszczepionej [9, 13, 16], szczególnie w przypadku udokumentowanego przełączenia produkowanych klas immunoglobulin z IgM na IgG [15, 16]. Nie ma natomiast danych, by przeciwciała klasy IgA, choć zdolne do aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej, wykazywały szkodliwe działanie wobec przeszczepu nerki [17]. Dlatego zaniechano dalszych badań nad ich wpływem na przeszczepy nerek.

### 8.13. Podsumowanie

Pomimo ogromnego postępu w zakresie immunosupresji przewlekłe odrzucanie jest główną przyczyną utraty czynności alloprzeszczepu w perspektywie dłuższej niż jednego rok. Wobec ostatnio coraz bardziej powszechnie akceptowanej teorii udziału przeciwciał w procesie przewlekłego odrzucania nakazuje to zwiększenie zainteresowania czułymi metodami ich wykrywania. Coraz bardziej powszechnie wykorzystywane techniki fazy stałej umożliwiające wykrywanie przeciwciał anty-HLA wpłynęły na znaczne zmniejszenie częstości wczesnej utraty przeszczepu. Próba krzyżowa analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, wykonana z zachowaniem powyżej opisanych zasad, pozostaje jednak ważnym i stosunkowo tanim narzędziem umożliwiającym wykrywanie swoistej dla dawcy immunizacji przed przeszczepieniem.

### Literatura

- [1] Garavoy M.R., Rheinschmidt M.A., Bigos M. i wsp. Flow cytometry analysis: A high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transpl. Proc.* 1983; 15: 1939-1944
- [2] Bray R.A. Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. *Methods Cell Biol.* 1994; 41: 103-119
- [3] Horsburgh T, Martin S, Robson A. The application of flow cytometry to histocompatibility testing. *Transpl. Immun.* 2000; 8: 3-15
- [4] Shenton B.K., Bell A.E., Harmer A.W. i wsp. Importance of methodology in the flow cytometric crossmatch: a multicentre study. *Transpl. Proc.* 1997; 29: 1454-1455
- [5] Lobo P.I., Spencer P.E., Isaacs R.B., McCullough C. Hyperacute renal allograft rejection from anti-HLA class I antibody to B cells; antibody detection by two color FCXM was possible only after using pronase-digested donor lymphocytes. *Transpl. Int.* 1997; 10: 69-73

- [6] Graff R.J., Xiao H., Schnitzler M.A. i wsp. The role of positive flow cytometry crossmatch in late renal allograft loss. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 502-505
- [7] Robson A., Martin S. T and B cell crossmatching using three-colour flow cytometry. *Transpl. Immunol.* 1996; 4: 203-208
- [8] Piątosza B., Rubik J., Grenda R. Is positive flow cytometric cross-match a risk factor for early cadaveric kidney graft dysfunction? *Transpl. Proc.* 2006; 38: 53-55
- [9] Piątosza B., Kwiatkowska A., Rubik J., Jarmużek W., Kluge P., Grenda R. The impact of donor-specific antibodies on graft outcome in pediatric renal transplantation from deceased donors. *Ann. Transpl.* 2011; 16 (4): 32-39
- [10] Thiyagarajan U.M., Bagul A., Frost J., Horsburgh T., Nicholson M.L. Role of human leukocyte antigen, donor-specific antibodies, and their impact in renal transplantation. *Transpl. Proc.* 2012; 44: 1231-1235
- [11] Ho E.K., Vasilescu E.R., Colovai AI i wsp. Sensitivity, specificity and clinical relevance of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplantation. *Transpl. Immun.* 2008; 20: 61-67
- [12] Lentine K.L., Graff R.J., Xiao H. i wsp. Flow cytometry crossmatch before kidney transplantation in contemporary practice: target cell utilization, results patterns, and associated long-term graft survival. *Clin. Transpl.* 2008; 253-266
- [13] Graff R.J., Buchanan P.M., Dzebisashvili N. i wsp. The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transpl. Proc.* 2010; 42: 3471-3474
- [14] Kerman R.H., Susskind B., Buysse I. i wsp.. Flow cytometry-detected IgG is not a contraindication to renal transplantation: IgM may be beneficial to outcome. *Transplantation* 1999; 68: 1855-1858
- [15] Lietz K., John R., Burke E. i wsp. Immunoglobulin M-to-immunoglobulin G anti-human leukocyte antigen class II antibody switching in cardiac transplant recipients is associated with an increased risk of cellular rejection and coronary artery disease. *Circulation* 2005; 112: 2468-2476
- [16] Stastny P., Ring S., Lu C., Arenas J., Han M., Lavigna B. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 600-604
- [17] Doran T.J., Süsal C., Opelz G., Geczy A.F. IgA class antibodies and flow cytometric cross-matching in renal transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 309-314

# OZNACZANIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH CYTOKIN METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ Z ZASTOSOWANIEM IMMUNOFLUORESCENCJI

Piotr Wierzbicki, Danuta Kłosowska

*Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii, Warszawski  
Uniwersytet Medyczny, Warszawa*

## Streszczenie

Cytokiny są kluczowymi mediatorami w regulacji funkcji układu odpornościowego. Dzięki zjawisku polaryzacji immunologicznej możliwe jest modulowanie typu odpowiedzi immunologicznej w kierunku mechanizmów komórkowych lub humoralnych. Istotną rolę w tym procesie pełnią limfocyty pomocnicze (TCD4+) występujące w dwóch podtypach: Th1 i Th2. Rolą limfocytów Th1 jest ich udział w reakcjach odpowiedzi komórkowej, między innymi w infekcjach powodowanych przez wirusy, pierwotniaki i w niszczeniu komórek nowotworowych, a poprzez sekrecję różnych cytokin np. TNF- $\alpha$  zwiększają liczbę komórek o tym fenotypie w ustroju. IL-10 jako jedna z cytokin syntetyzowanych przez subpopulację komórek Th2 jest odpowiedzialna za rozwój mechanizmów odpowiedzi humoralnej np. w infekcjach bakteryjnych, sprzyja też rozwojowi alergii. Diagnostyka oznaczania cytokin oraz ich receptorów w płynach ustrojowych i tkankach może wspierać leczenie różnych stanów chorobowych. Terapia cytokinowa jest obecnie stosowana w leczeniu np. zapalenia wątroby typu C, nawykowych poronień u kobiet, leczeniu alergii czy chorobach nowotworowych.

*Słowa kluczowe:* cytokiny, Th1/Th2, polaryzacja immunologiczna

## 9.1. Wstęp

Cytokiny są cząsteczkami o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania organizmu. Białka te regulują tak różnorodne procesy jak proliferacja, różnicowanie czy też ruchliwość komórek. Cytokiny wytwarzane przez komórki układu odpornościowego stają się mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych, uczestniczą też w regulacji krwiotworzenia. Często określa się je jako hormony układu odpornościowego. Duża liczba cytokin (ponad sto kilkadziesiąt opisanych, a wciąż

odkrywane są nowe) powoduje, że powstaje niezwykle skuteczny, ale także bardzo skomplikowany i czuły system powiązań (tzw. sieć cytokin) pomiędzy komórkami. Dodatkowo wpływając nie tylko na leukocyty, ale i na inne komórki organizmu mogą stymulować gorączkę (poprzez tzw. pirogeny), regulować morfogenezę komórek i tkanek lub brać udział w procesach patologicznych poprzez działanie cytotoksyczne.

Cytokiny ze względu na funkcje i znaczne podobieństwa strukturalne można podzielić na kilka grup:

1. Interleukiny - umożliwiające komunikowanie się komórek między sobą.
2. Hematopoetyny – wpływające na procesy różnicowania komórek szlaku krwiotworzenia (np. GM-CSF, G-CSF),
3. Interferony – zaangażowane w obronę przeciwwirusową,
4. Chemokiny – wyznaczające gradient chemotaktyczny, którego śladem leukocyty podążają do miejsca zapalenia,
5. Nadrodzina cząsteczek TNF – wśród nich TNF- $\alpha$ , jedna z najważniejszych cytokin prozapalnych i cytotoksycznych,
6. Inne cytokiny – ważniejszy z nich to TGF- $\beta$  odpowiedzialny za hamowanie odpowiedzi odpornościowej.

Cytokiny inicjują szereg procesów mających ogromne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Wykazują też zdolność do oddziaływania na komórki je wytwarzające (autokrynia), na inne komórki znajdujące się w pobliżu (parakrynia), bądź na oddalone komórki organizmu poprzez układ krwionośny (endokrynia). Do innych właściwości zalicza się:

1. Plejotropia – polegająca na tym, że dana cytokina może wykazywać różny wpływ na różne komórki, np. IFN- $\gamma$  stymuluje rozwój limfocytów Th1 i aktywuje makrofagi, natomiast hamuje rozwój limfocytów o fenotypie Th2.
2. Redundancja – różne cytokiny wpływają jednakowo na daną populację komórek, np. IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  pobudzają komórki NK.
3. Synergizm – cytokiny działając wspólnie wzmacniają efekt działania, niż w przypadku ich osobnego wpływu, np. IL-6 i IL-7 razem pobudzają limfopoezę silniej niż każda z nich osobno.
4. Antagonizm – efekt przeciwstawnego działania dwóch lub więcej cytokin, np. TNF- $\alpha$  jest antagonistą TGF- $\beta$ , który działa supresyjnie.
5. Sprzężenie zwrotne dodatnie – gdy jedna cytokina wydzielana stymuluje wydzielanie innej zwrotnie, np. sekrecja IL-12 z makrofagów stymuluje komórki NK do produkcji IFN- $\gamma$ , który pobudza makrofagi do dalszego wydzielania IL-12.
6. Sprzężenie zwrotne ujemne - gdy jedna cytokina wydzielana hamuje wydzielanie innej zwrotnie, np. IFN- $\gamma$  wydzielany przez komórki Th1 pobudza makrofagi do syntezy IL-10 co hamuje wydzielanie IFN- $\gamma$  przez komórki Th1.

Należy nadmienić, że skuteczność działania cytokin uzależniona jest od obecności swoistych dla nich receptorów na komórkach docelowych i że wrażliwość limfocytów na te mediatory zależy od uprzedniego rozpoznania antygeny przez T



Cell Receptor lub B Cell Receptor. [1] Duże znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego spełnia zjawisko polaryzacji immunologicznej. Pozwala on na regulację układu immunologicznego na określony typ patogenu. W wyniku działania antygeny oraz innych czynników (głównie cytokin) dochodzi do różnicowania się limfocytów Th0 w jeden z dwóch podtypów: Limfocyty Th1 syntetyzują takie cytokiny jak: IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i wpływają na rozwijanie się odpowiedzi komórkowej (pozapalnej), Limfocyty Th2 promują z kolei rozwój odpowiedzi komórkowej dzięki wydzielaniu takich cytokin jak np.: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 [2]

W zależności od czynnika etiologicznego, czy jest on zewnątrzkomórkowy jak np. bakterie, czy też wewnątrzkomórkowy jak np. wirusy, ważny jest rozwój odpowiedniego typu odpowiedzi immunologicznej umożliwiając jego eliminację. Proces polaryzacji immunologicznej pozwala na ukierunkowanie różnicowania komórek Th0 w określony podtyp, w zależności od rodzaju patogenu. W przypadku zwalczania patogenów zewnątrzkomórkowych ( infekcje bakteryjne) uruchamiane są mechanizmy humoralne związane z produkcją przeciwciał opłaszczających (opsonizacja) patogen i eliminowanie go przez komórki żerne. Natomiast odpowiedź komórkowa preferowana jest, gdy patogen jest wewnątrzkomórkowy (np. wirusy) i związana jest między innymi z aktywacją komórek NK i limfocytów cytotoksycznych. Także gatunki bakterii występujące w formie wewnątrzkomórkowej np. prątek gruźlicy są zwalczane z udziałem tego typu odpowiedzi. Komórki Th1 i Th2 mogą pozostawać w równowadze, albo któryś z tych typów komórek może uzyskać przewagę. W regulacji rodzaju odpowiedzi ważne jest to, że obie populacje działają na siebie antagonistycznie. Wydzielane przez nie cytokiny mają zdolność hamowania rozwoju i funkcji drugiego typu komórek uruchamiając tym samym mechanizmy odpowiedzi humoralnej lub typu komórkowego [1].

Diagnostyka oznaczania cytokin oraz ich receptorów zarówno w surowicy krwi czy supernatantach hodowlanych (np. metodą ELISA), w tkankach (np. metodą immunohistochemiczną), stężenia mRNA w komórkach (PCR), czy jako zdolność określonej komórki do syntezy wewnątrzkomórkowej cytokiny (metodą cytometrii przepływowej) stwarza możliwość wyboru odpowiedniej terapii w patogenezie wielu chorób [3].

## 9.2. Metodyka

Do oznaczania wewnątrzkomórkowych cytokin: TNF- $\alpha$  i IL-10 stosuje się zestaw Fixation/Permeabilization Kit with Golgi Stop (BDBiosciences) zawierający 3 składniki: odczynnik do permeabilizacji błony komórkowej, odczynnik do płukania komórek (Perm Wash) i odczynnik – inhibitor sekrecji cytokin z komórki (Golgi Stop). Populację limfocytów z krwi obwodowej uzyskuje się poprzez wirowanie na gradiencie gęstości preparatu Gradisol L (Aqua Med.). Wyizolowane limfocyty hoduje się w standardowym środowisku hodowlanym (RPMI+1% FCS) przez 24 godziny w stężeniu  $1 \times 10^6$  komórek/ml w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Na 5 godzin przed rozpoczęciem procedury oznaczania cytokin

do hodowli dodaje się PMA (Sigma) (50ng/ml), jonomycynę (Sigma) (1μg/ml) oraz 2 μl odczynnika Golgi Stop z kitu. Po zakończeniu hodowli komórki płucze się w Staining Buforze (PBS bez jonów Ca<sup>+</sup> i Mg<sup>+</sup> + 0,01% NaN<sub>3</sub>). Do znakowania zewnątrzkomórkowych receptorów na komórkach stosuje się odpowiednie przeciwciała monoklonalne: CD4-Pe, CD4-FITC oraz CD3-PerCP (BDBiosciences) (inkubacja 15 minut w temperaturze pokojowej), natomiast do badanych wewnątrzkomórkowych cytokin przeciwciała: anti human IL-10-PE i anti human TNF-α-FITC (Pharmingen) (inkubacja 30 minut w 4°C). Do utrwalenia znakowania przeciwciałami i permeabilizacji błony komórkowej stosuje się odczynniki z w/w kitu zgodnie z zaleceniami producenta. Do oceny ekspresji badanych cytokin zastosowano cytometrię przepływową (aparat FACSCalibur, BDBiosciences) i program CellQuest. Wyniki przedstawiane są jako odsetek limfocytów CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> wykazujących ekspresję badanych cytokin.

### 9.3. Wyniki

Wyniki oznaczania wewnątrzkomórkowych cytokin w populacji ludzkich limfocytów z krwi obwodowej otrzymywane w naszym Zakładzie są wykorzystywane w leczeniu niepłodności i nawykowych poronień u kobiet, na zlecenie innych jednostek współpracujących z nami. W prawidłowym rozwoju zarodka istotna jest przewaga limfocytów Th2 w stosunku do Th1. Między innymi takie cytokiny jak IL-10 promują rozwój limfocytów Th2, a więc odpowiedź humoralną, jednocześnie hamując różnicowanie się limfocytów Th1 odpowiedzialnych za rozwój mechanizmów typu komórkowego. W interpretacji wyników ważna jest proporcja odsetka limfocytów syntetyzujących TNF-α (Th1) do limfocytów wydzielających IL-10 (Th2). Proporcja ta nie powinna przekraczać wartości 30,6. Limfocyty Th2 wpływają na syntezę swoistych przeciwciał, które opłaszczając trofoblast utrudniają rozpoznanie antygenów pochodzenia ojcowskiego przez immunokompetentne komórki macierne, sprzyjając dalszemu rozwojowi zarodka [4, 5].

Dzięki wykorzystywaniu takiej metody diagnostycznej można modyfikować różnicowanie się limfocytów w jeden z w/w podtypów i zastosować odpowiednią terapię, wspierając w ten sposób proces leczenia.

### 9.4. Podsumowanie

Cytokiny ze względu na swoją immunomodulacyjną rolę są coraz powszechnie stosowane w immunoterapii. Dlatego też rozwój metod diagnostycznych ich oznaczania może wspierać wybór odpowiedniej terapii w patogenezie różnych stanów chorobowych. Jednak ze względu na złożoność sieci cytokin, wprowadzenie dodatkowej cytokiny lub zmiana jej stężenia w ustroju może rozregulować cały system. Efekt plejotropowy cytokin może z kolei wywoływać nie zawsze przewidywalne silne efekty uboczne [1]. Mimo tej złożoności działania, niektóre z nich są już stosowane w terapii, prowadzi się także intensywne badania nad możliwością wprowadzenia ich w patogenezie wielu chorób. Przeciwwirusowe właściwości interferonów np. IFN-α wraz z rybawiryną stosowane są w le-

czeniu zapalenia wątroby typu C [6]. Obecność IFN- $\alpha$  w terapii jest związana z supresyjnym działaniem tej cytokiny na replikację wirusa zarówno w wątrobie, jak i w komórkach jednojądrzastych (PBMC) [7]. Immunosupresyjne efekty IL-10 próbuje się wykorzystać w chorobach o podłożu zapalnym, także w hamowaniu odrzucania przeszczepów [8]. G-CSF stosowany jest w leczeniu niedoboru granulocytów [9]. Komórki nowotworowe są niszczone przez limfocyty Tc i komórki NK [10], dlatego terapia wymaga pobudzenia komórkowych mechanizmów odpornościowych, a więc wygenerowania w organizmie subpopulacji limfocytów Th1 [11]. W chorobach o podłożu alergicznym u chorych dominują limfocyty Th2. Przekierowanie odpowiedzi w stronę mechanizmów komórkowych poprzez zwiększenie populacji limfocytów Th1 może łagodzić objawy chorobowe. Stosowana tzw. szczepionka przeciwalergiczna powoduje właśnie spadek ilości komórek Th2, zwiększając populację limfocytów Th1 [12]. W oparciu o dane z licznych publikacji można stwierdzić, że diagnostyka oznaczania cytokin pozwalająca na określenie liczby i funkcji komórek immunokompetentnych o fenotypie Th1/Th2 może być pomocna w wyborze najbardziej efektywnej terapii w leczeniu wielu schorzeń o podłożu immunologicznym [2].

## Literatura

- [1] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W.: Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002; Warszawa
- [2] Bienvenu J., Monneret G., Fabien N., Revillard J.P.: The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab Med.*, 2000; 38: 267-285
- [3] Inglot M., Gładysz A., Rymer W., Molin I., Zalewska M., Machaj A.: Badanie wybranych cytokin w surowicy krwi pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C nieleczonych oraz leczonych interferonem alfa i rybawiryną. *Wiad. Lek.*, 2008; 61(1-3): 13-18
- [4] Kruse C., Varming K., Christiansen O.B.: Prospective, serial investigations of in-vitro lymphocyte cytokine production, CD62 L expression and proliferative response to microbial antigens in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod.*, 2003; 18: 2465-2472
- [5] Winger E.E., Reed J.L., Ashoush S., El-toukhy T., Ahuja S., Taranissi M.: Elevated pre-conception CD56+ CD16+ and/or Th1:Th2 levels predict benefit from IVIG therapy in subfertile women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol.*, 2011; 66: 394-403
- [6] Martin J., Navas S., Quiroga J.A., Pardo M., Carreno V.: Effects of the ribavarin -interferon alpha combination on cultured peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C. *Cytokine*, 1998; 10: 635-644
- [7] Siwiec J., Zaborowski T., Jankowska O., Wojas-Krawczyk K., Krawczyk P., Milanowski J.: Ocena równowagi limfocytów Th1/Th2 oraz ekspresji receptorów dla liposacharydu u chorych na astmę. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2009; 77: 123-130
- [8] Lee B., Oh C.K., Kim M.S. i wsp. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells during acute renal allograft rejection. *Transplant Proc.*, 2012 Jan; 44(1): 236-40
- [9] Hosing C.: Hematopoietic Stem Cell Mobilization with G-CSF. *Methods Mol Biol.*, 2012; 904: 37-47

- [10] Thum M.Y.: The relationship of systemic TNF-alpha and IFN-gamma with IVF treatment outcome and peripheral blood NK cells. *Am J Reprod Immunol.*, 2007; 57: 210-217
- [11] Godin-Ethier J., Pelletier S., Hanafi L.A. i wsp.: Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol.*, 2009; 183(12): 7752-7760
- [12] Larche M., Robinson D.S., Kay A.B.: The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin.*, 2003; 111(3): 450-463

# LICZBA TREC JAKO MARKER DIAGNOSTYCZNY LIMFOPOEZY

Barbara Wysoczańska

*Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu*

## Streszczenie

Procesy zachodzące w mikrośrodowisku grasicy zapewniają dostarczenie do krwi i narządów obwodowych dojrzałych limfocytów T zróżnicowanych odnośnie repertuaru receptorów TCR. Podczas procesu rearanżacji TCR dochodzi do rekombinacyjnego wycinania kolistych fragmentów DNA, które jako episomalne cząstki pozostają w komórce dziewiczej (naiwnej) opuszczającej grasicę. Koliste cząstki DNA – TREC (*TCR excision circles*) mimo, iż nie posiadają funkcjonalnego znaczenia, poprzez swą obecność w komórce dziewiczej świadczą o prawidłowym przebiegu procesu rearanżacji TCR. Proporcja sjTREC/ $\beta$ TREC odzwierciedla indeks proliferacyjny komórki, liczba sjTREC wskazuje na rearanżację TCR $\alpha$  (delecja fragmentu  $\delta$ ), liczba  $\beta$ TREC wskazuje na formowania TCR $\beta$  (rearanżacja D $\beta$ /J $\beta$ ). Obecność TREC w komórkach opuszczających grasicę (ang. *recent thymic emigrants*, RTE) jest wyrazem prawidłowo funkcjonującej grasicy. Monitorowanie liczby TREC stanowi dogodny marker diagnostyczny w wielu sytuacjach klinicznych człowieka. Wykorzystanie techniki PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) do określenia liczby TREC ma znaczenie diagnostyczne w rozpoznaniu wrodzonych i nabytych niedoborów odporności w trakcie terapii oraz w monitorowaniu grasiczo - zależnej odnowy immunologicznej po alogenicznym przeszczepieniu komórek hematopoetycznych (HCT). Zmniejszenie liczby TREC jest wyrazem zmian związanych z procesem zaburzonej limfopoezy. Brak obecności TREC u noworodków może świadczyć o wrodzonych niedoborach odporności np. SCID. Wystąpienie infekcji oportunistycznych oraz innych powikłań po HCT np. GVHD charakteryzuje obniżona liczba TREC. Czynniki wpływającymi na zmniejszenie liczby TREC są procesy związane z biologią komórki (prolifracja, apoptoza, wewnątrzkomórkowa degradacja). Liczba TREC odzwierciedla swoistą równowagę (homeostazę) obwodowych limfocytów T i koreluje ze zróżnicowanym repertuarem TCR. W procesie inwolucji grasicy obserwowane jest obniżenie liczby TREC wraz z upływem wieku.

*Słowa kluczowe:* TREC, TCR, grasica, inwolucja, SCID, HCT

## 10.1. Wstęp

Grasica jest organem limfoidalnym, w którym zachodzi ontogeneza limfocytów T. Poprzez etapy pozytywnej i negatywnej selekcji grasicę opuszczają dojrzałe limfocyty T niosące na swej powierzchni zróżnicowany repertuar receptorów TCR. Limfocyty T opuszczające grasicę są komórkami dziewiczymi (naiwnymi) zasiedlającymi narządy obwodowe, które po antygenowym bodźcu stają się pulą komórek efektorowych i/lub pamięci [1]. Układ immunologiczny dąży do zachowania stanu równowagi pomiędzy pulą komórek dziewiczych i pulą komórek efektorowych. W wielu sytuacjach klinicznych stwierdza się zaburzony proces limfopoezy. U pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) do krwi obwodowej migrują limfocyty T zatrzymane we wczesnej fazie dojrzewania i zróżnicowania, a klonalność repertuaru TCR świadczy o chorobie układu hematopoetycznego. Ubytek liczbowy limfocytów T występuje w początkowym etapie odnowy immunologicznej po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych (HCT), dopóki komórki dawcy nie zasiedlą grasicy wyniszczzonej stosowaną przed przeszczepieniem procedurą chemio- /radioterapii. Pula limfocytów T może ulec zaburzeniu również w późniejszym okresie po przeszczepieniu, np. w przypadku wystąpienia powikłań typu choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) oraz podczas reaktywacji wirusowych [2–4]. Szczególną rolę prawidłowej odnowy immunologicznej przypisuje się po przeszczepieniu pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności np. SCID (*severe combined immunodeficiencies*) [5]. Pacjentów SCID cechuje genetycznie uwarunkowany zaburzony proces limfopoezy, związany z funkcjonalnie nieprawidłową pracą grasicy. Alogeniczne przeszczepienie komórek krwiotwórczych u dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności jest procedurą warunkującą ich dalsze przeżycie. Po przeszczepieniu obserwuje się u nich ponowienie prawidłowej funkcji grasicy [6, 7]. Wzrost liczby limfocytów T obserwuje się również u pacjentów z infekcją wirusem HIV poddanych terapii antywirusowej. Zastosowanie terapii HAART (*highly active antiretroviral therapy*) powoduje przywrócenie prawidłowej proporcji limfocytów T [8, 9]. Odzwierciedleniem prawidłowej funkcji grasicy jest obecność we krwi obwodowej komórek dziewiczych zawierających kolistą cząsteczkę DNA-TREC (ang. *T-cell receptor rearrangements excision circles*). Episomalne cząsteczki TREC są stałym elementem komórek dziewiczych bezpośrednio opuszczających grasicę po odbytym procesie rearanzacji receptorów  $TCR\alpha$  i  $TCR\beta$ . TREC nie są powielane podczas podziałów mitotycznych do komórek siostrzanych, a ich obecność odpowiada liczbie komórek dziewiczych bezpośrednio opuszczających grasicę (ang. *recent thymic emigrants*, RTE). TREC stanowią dogodny marker diagnostyczny i świadczą o prawidłowej limfopoezie [10]. Cytometryczne metody immunofenotypowania pozwalają na precyzyjne określenie puli komórek dziewiczych u pacjenta w określonej sytuacji klinicznej. Markerami powierzchniowymi, których ekspresję stwierdza się na komórce dziewiczej są: CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD31 (PECAM-1). Dodatkowo zastosowanie współczesnych technik biologii molekularnej, jaką jest reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR), pozwala precyzyjnie określić liczbę komórek dziewiczych zawierających TREC. Badanie liczby TREC stanowiącej odzwierciedlenie prawidłowej funkcji grasicy

ma swoje uzasadnienie w diagnostyce pacjentów po alogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych (HCT), w diagnostyce wrodzonych niedoborów odporności np. SCID u noworodków, w terapii nabytych niedoborów odporności, w sytuacjach kliniki człowieka dotyczącej procesu inwolucji grasicy oraz w wybranych aspektach dotyczących podłoża rozwoju niektórych chorób autoimmunologicznych [11–13].

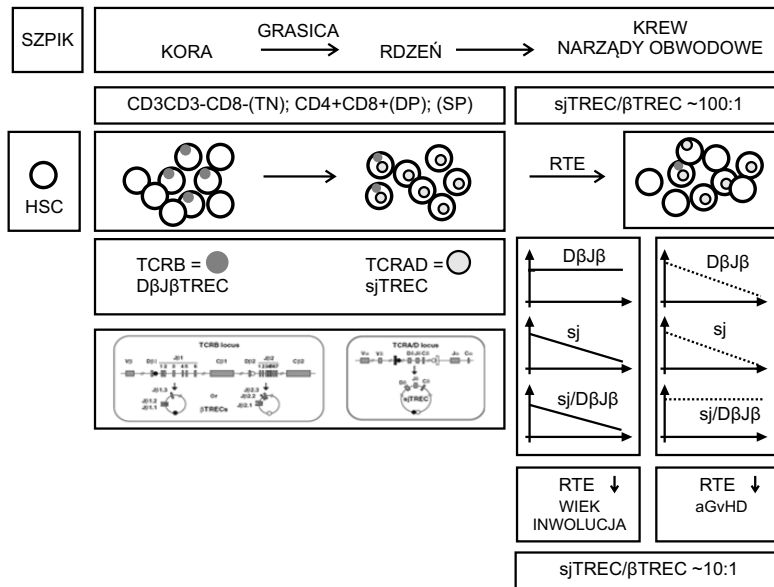
## 10.2. Formowanie kolistej cząsteczki DNA – TREC

Komórki T opuszczające grasicę można zróżnicować pod względem ekspresji łańcuchów TCR. Wyróżnia się limfocyty T zawierające na swej powierzchni receptory TCR $\alpha\beta$  lub TCR $\gamma\delta$ . Zawartość procentowa tych subpopulacji we krwi obwodowej wynosi ponad 90% dla komórek T z ekspresją TCR $\alpha\beta$  oraz 5–10% komórek T z ekspresją TCR $\gamma\delta$ . Formowanie receptorów TCR poprzedzone jest wieloetapowym procesem rekombinacji pod kontrolą IL-7 oraz genów aktywujących rekombinację RAG1/RAG2 (ang. *recombination activating genes*). Powstawanie dojrzałej formy funkcjonalnego receptora TCR polega na połączeniu się wielu segmentów V(D)J (ang. *variable, diversity, joining*). Kombinacje wielu łączy segmentów stanowi o ich różnorodności i szacuje się na około  $10^{18}$  dla TCR $\alpha\beta$ . Procesowi rearanżacji towarzyszy nie tylko przypadkowe łączenie się segmentów V(D)J, ale również wstawianie pomiędzy istniejące segmenty różnej liczby wstawek N nukleotydowych z udziałem terminalnej transferazy nukleotydowej (TdT). Gwarantuje to dużą zmienność i różnorodność polimorficzną receptorów TCR. Podczas procesu rearanżacji łańcucha  $\beta$  i  $\alpha$  dochodzi do wycinania kolistych fragmentów nukleotydowych TREC (ang. *T-cell receptor rearrangements excision circles*). Powstawanie cząsteczek sjTREC (ang. *signal joint*) oraz  $\beta$ TREC (V $\beta$ J $\beta$ ) przedstawiono na Rycinie 10.1 [14, 15]. Episomalna cząsteczka DNA-TREC pozostaje w komórce maczynnej T i nie podlega późniejszym podziałom mitotycznym, a zatem nie powiela się do komórki siostrzanej. Wycięte fragmenty DNA  $\delta$ rec/ $\psi$ J $\alpha$  związane z delecją fragmentu  $\delta$  biorą udział w dalszym procesie rearanżacji i prowadzą do uformowania funkcjonalnego łańcucha TCR $\alpha$ . Koliste fragmenty DNA sjTREC/ $\beta$ TREC pozostają na stałe w komórce dziewiczej, która opuszcza grasicę przedostając się do krwi i narządów obwodowych [11].

## 10.3. Metody identyfikacji TREC

Określenie liczby TREC jest możliwe z wykorzystaniem współczesnych metod biologii molekularnej [16]. Cząsteczki sjTREC mogą być identyfikowane ilościowo metodą reakcji łańcuchowej polimerazy czasu rzeczywistego (qPCR) z odpowiednio dobraną sekwencją starterów obejmujących fragment kolistej DNA. Przykładowe sekwencje starterów obejmują: 5'- AAC AGC CTT TGG GAC ACT ATC-3' oraz 5'- GCT GAA CTT ATT GCA ACT CGT GAG-3' wraz z sondą identyfikującą 5'- 6FAM-CCA CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC-TAMRA-3' [17]. sjTREC można określić w populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMNC) lub we frakcji komórek T po zastosowaniu metod selekcji pozytywnej

lub negatywnej np. z użyciem komercyjnych zestawów Rosette-Sep T-cell enrichment cocktail (Stem Cell Technologies). Aby zwiększyć czułość i precyzję pomiaru sjTREC stosuje się dodatkowo metody sortowania limfocytów T o fenotypie komórek dziewiczych. Liczbę sjTREC można wyrazić wobec względnej ilości wyizolowanego DNA (sjTREC/ $\mu\text{g}$  DNA), w przeliczeniu na zawartość komórek o specyficznym fenotypie np. sjTREC/ $10^5$  PBMNC, sjTREC/CD3+, sjTREC/CD4+, sjTREC/CD8+, sjTREC/CD4+CD45RA+CD27+.



Rycina 10.1: Schemat procesu limfopoezy uwzględniający proces reorganizacji receptorów TCRB/TCRA oraz powstawania kolistych cząstek DNA - TREC (*TCR rearrangements excision circles*) w grasicy. TREC zawarte w komórkach opuszczających grasicę (ang. *recent thymic emigrants*, RTE) powstają podczas rekombinacji segmentów TCRB/TCRAD. Komórka progenitorowa HSC (ang. *human stem cell*) migruje ze szpiku do kory grasicy, w jej mikrośrodkowisku limfocyty potrójnie negatywne (ang. *triple negative*, TN) proliferują i formują powierzchniowe receptory TCRB. W procesie reorganizacji powstaje kolista cząstka D $\beta$ J $\beta$ TREC (symbol - kółko zamknięte). W stadium podwójnie pozytywnych limfocytów T (ang. *double positive*, DP) w rdzeniu grasicy przebiega proces reorganizacji receptorów TCRA. Poprzez wycięcie fragmentu D formowany jest receptor TCRA oraz kolista cząstka sjTREC (symbol - kółko otwarte). Limfocyty T pojedynczo pozytywne (ang. *single positive*, SP) opuszczają grasicę jako komórki dziewicze (naiwne) zasiedlając krew i narządy obwodowe. Koliste cząstki DNA sjTREC/ $\beta$ TREC zawarte w limfocytach T dziewiczych odzwierciedlają prawidłową funkcję grasicy. Ich proporcja w sytuacjach klinicznie prawidłowych odzwierciedla indeks proliferacyjny (100:1), podczas procesu inwolucji grasicy, jak również podczas wystąpienia powikłań po przeszczepieniu np. aGVHD, liczba komórek RTE zmniejsza się (sjTREC/ $\beta$ TREC; 10:1). Schemat zmodyfikowany wg Krenger i wsp. [14] oraz Toubert i wsp. [15].



Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na możliwość wykorzystania prostej i wydajnej metody oznaczenia liczby TREC z niewielkiej ilości krwi obwodowej (300  $\mu$ l), uwzględniającą liczbę TREC/ml [16]. Do precyzyjnego wyrażenia liczby sjTREC konieczne jest stosowanie kontroli pozytywnej, którą może być liczba kopii genu konstytutywnego (np. GAPDH lub  $\beta$ -aktyna). Niezbędnym do obliczenia liczby sjTREC jest użycie standardu wewnętrznego sjTREC przez wprowadzenie właściwego insertu np. do wektora pTZ57R/T. Liczba sjTREC wyrażona wobec całkowitej liczby limfocytów CD3+ precyzuje liczbę komórek, które opuściły grasicę, a dodatkowy indeks proliferacji komórek, wyrażony przez pomiar antygenu Ki67 lub proporcji sjTREC/ $\beta$ TREC uwierzytelnia precyzję wykonanego pomiaru [2].

#### 10.4. Liczba TREC u pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności

Odnowa limfocytów T u pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności, a zwłaszcza z ciężkim złożonym niedoborem SCID (ang. *severe combined immunodeficiencies*) jest szczególnie istotna po terapii alogenicznego przeszczepiania komórek krwiotwórczych [5, 12]. Wrodzone niedobory odporności w etiologii schorzenia charakteryzują się licznymi wadami genetycznymi upośledzającymi prawidłową limfopoezę. Chorzy ze SCID mają zredukowaną masę grasicy i częsty fenotyp choroby nosi znamię fenotypowe T-. Towarzyszy temu upośledzenie innych populacji komórkowych np. B- i/lub NK-. U dzieci z wrodzonymi niedoborami obserwuje się zmiany strukturalne grasicy ze zmniejszeniem ciężaru wagowego narządu do około 1 g. Hypoplastyczność narządu, zredukowana liczba komórek nabłonkowych i dendrytycznych oraz brak jednoznacznego podziału struktury grasicy na korę i rdzeń to cechy zdefiniowanej grasicy u pacjentów SCID. Dla dzieci z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi oprócz terapii genowej przeszczepienie komórek krwiotwórczych (HCT) jest jedyną terapią leczniczą ratującą ich życie. Zastąpienie zdrowymi komórkami dawcy ubytku ilościowego i czynnościowego limfocytów T pacjenta gwarantuje jego dalsze przeżycie. Monitorowanie liczby TREC u dzieci ze SCID po przeszczepieniu odzwierciedla prawidłowe funkcje grasicy, o czym świadczy profil odnowy immunologicznej. Przed przeszczepieniem oddziaływanie między prekursorami limfocytów T i komórkami nabłonka grasicy jest zaburzone i nie w pełni sprzyja dojrzewaniu tymocytów. Zasiedlenie komórkami dawcy mobilizuje grasicę do podjęcia swej funkcjonalnej aktywności i przywraca prawidłową oogenezę limfocytów T. W szeregu doniesieniach badawczych i klinicznych określenie liczby TREC przed, jak i po HCT dokumentuje prawidłową odnowę immunologiczną [7, 18]. Wykazano również zależność pomiędzy liczbą TREC a poliklonalnym repertuarem TCR u dzieci z wrodzonymi niedoborami po HCT [6]. Kolejne badania odzwierciedlają zależność pomiędzy typem chimeryzmu a obecnością sjTREC u dzieci SCID. Pacjenci, którzy posiadali pełny chimeryzm dawcy (również w linii mieloidalnej) po zastosowaniu mieloablacyjnej terapii charakteryzowali się obecnością wysokiej liczby sjTREC w porównaniu z pacjentami z chimeryzmem miesza-

nym [19]. Z obserwacji własnych wynika, że pacjenci z niedoborami odporności po HCT posiadający TREC+ ( $>10$  TREC/ $10^5$  komórek), charakteryzowali się wyższą limfocytozą i posiadali większy odsetek komórek CD4+ i CD8+ w porównaniu z pacjentami TREC- [20]. Kompleksowe badania diagnostyczne określające fenotyp, poziom immunoglobulin, liczbę TREC oraz spektrotyp TCR wykonane w różnym odstępie czasowym po HCT są niezbędne w celu odzwierciedlenia kinetyki prawidłowej odnowy immunologicznej u dzieci z wrodzonymi niedoborami odporności. Szczególną uwagę zwraca się na możliwie szybkie rozpoznanie niedoborów odporności we wczesnym okresie po porodzie. Czas określenia parametrów diagnostycznych i klinicznych specyficznych dla wrodzonych niedoborów odporności ma swe korzystne wskazanie do wdrożeniu terapii leczniczej u noworodków z niedoborami. Współcześnie stosowane metody monitorujące obecność sjTREC służą jako wskaźnik niedoborów i stanowią wspomagające narzędzie diagnostyczne do prawidłowego potwierdzenia rozpoznania. Wykorzystanie testu z użyciem karty Guthrie (ang. *neonatal Guthrie test*) stało się powszechnie używane w laboratoriach diagnostycznych i wykorzystane we wczesnym rozpoznawaniu wrodzonych niedoborów odporności u noworodków [21, 22].

## 10.5. Liczba TREC u pacjentów po HCT

O powodzeniu przeszczepu świadczy prawidłowa odnowa hematologiczna i immunologiczna gwarantująca długoterminowe przeżycie pacjenta, nieobarzonego powikłaniami po przeszczepieniu. Terapia warunkująca przeszczep komórek krwiotwórczych odgrywa istotną rolę w tempie odnowy immunologicznej i hematologicznej. Komponenty mieloablacyjnego warunkowania złożone z silnego chemioterapeutyku lub warunkowanie o zredukowanej intensywności zasadniczo wpływają na tempo odnowy immunologicznej pacjenta po przeszczepie, co ma swe odzwierciedlenie w postaci pełnego lub mieszanego chimeryzmu. Rodzaj zastosowanej terapii warunkującej przyjęcie się przeszczepu może powodować długotrwały niedobór immunologiczny u biorcy dopóki zasiedlające się komórki dawcy nie zrekompensują tego ubytku. Chemioterapia jest bodźcem uszkadzającym narządy limfopoezy w tym grasicę [3, 14]. Czas odnowy immunologicznej i hematologicznej mierzony po przeszczepieniu odzwierciedla tempo odnowy i jest miernikiem immunokompetencji biorcy przeszczepu. Jest to okres, podczas którego dochodzi do największej liczby powikłań typu wzmózonych reaktywacji wirusowych, pojawiania się choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi oraz wznowienia choroby podstawowej [4]. Kinetyka odnowy immunologicznej dotyczącej linii limfocytów T po przeszczepie zależy w dużym stopniu od funkcjonalnej pracy grasicy biorcy. Istotnym jest więc monitorowanie odnowy limfocytów T u pacjentów po HCT nie tylko pod względem ilościowym i fenotypowym, ale również pod względem funkcjonalnym, czego odzwierciedleniem może być badanie różnorodności repertuaru receptorów TCR (spektrotyp), badanie klonalności TCR (rearanżacje klonalne), oraz badanie poziomu ekspresji genów biorących udział w szlaku rozwojowym limfocytów T np. NOTCH1 [15, 23]. Rekonstytucja komórkami dawcy po przeszczepie jest procesem bimo-

dalnym i charakteryzuje się dwuetapowym procesem odnowy immunologicznej grasiczo-niezależnym i grasiczo-zależnym. Etap grasiczo-niezależny charakteryzuje się wczesną ekspansją komórek dojrzałych T dawcy, odpowiedź ta jest antygenowo - zależna, związana z obecnością komórek CD8+ dawcy oraz obecnością klonów komórek aloreaktywnych. W procesie odnowy grasiczo - niezależnej, komórki pochodzące od dawcy są komórkami dojrzałymi o fenotypie komórek pamięci immunologicznej oraz komórkami efektorowymi. Na etapie odnowy immunologicznej grasiczo-zależnej nowo powstałe komórki wywodzą się z grasicy i charakteryzują się fenotypem komórek dziewiczych-naiwnych. Istotą wielu badań klinicznych jest określenie liczby kolistej cząstki DNA - TREC zawartej w komórkach dziewiczych, które opuszczają prawidłowo funkcjonującą grasicę u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego po przeszczepieniu [11, 14]. Zasadność badania liczby sjTREC u tych pacjentów wynika z konieczności monitorowania przebiegu prawidłowej odnowy immunologicznej biorcy, u którego niejednokrotnie dochodzi do wielu komplikacji związanych z procedurą przeszczepienia. Ocena liczby sjTREC w kontekście przeszczepów alogenicznych dotyczy sytuacji, kiedy mamy do czynienia z prawidłową odnową immunologiczną oraz w sytuacjach, kiedy dochodzi do zaburzenia odnowy i wystąpienia powikłań związanych z pojawieniem się ostrej lub przewlekłej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) czy też reaktywacji wirusowych. Badania liczby sjTREC mogą dotyczyć zarówno dawców jak i biorców przed przeszczepem [2, 4]. Kolistę cząstkę TREC nie są obecne wkrótce po przeszczepie, ich obecność stwierdza się około 60 dnia po transplantacji, a liczba TREC związana jest z odpowiednim przedziałem wiekowym dawcy i biorcy, rodzajem chemioterapii oraz stosowaną immunosupresją. Weinberg i wsp. u pacjentów będących 6 lat po alogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych badali częstość wystąpienia komórek naiwnych oraz obecność sjTREC we krwi obwodowej w zależności od wieku pacjenta i rodzaju dawcy [24]. Wystąpienie komplikacji po przeszczepie w postaci GVHD wpływa na proces tymopoezy. U pacjentów z GVHD obserwuje się obniżenie liczby sjTREC. Badania własne potwierdziły tę obserwację [25]. Pacjenci po HCT badani powyżej 100 dnia od czasu podania komórek macierzystych, u których rozwinęła się przewlekła postać choroby GVHD mieli obniżoną liczbę sjTREC w porównaniu do pacjentów bez objawów tej choroby, ponadto liczba sjTREC była wyższa u pacjentów z cGVHD w postaci narządowo ograniczonej, w porównaniu do pacjentów z objawami wielonarządowymi. Liczba sjTREC może mieć znaczenie prognostyczne, kiedy określona liczba sjTREC przed HCT ma wpływ na losy pacjenta po przeszczepie [2]. Możliwość oceny prawidłowej odnowy immunologicznej poprzez badana fenotypowe, określenie różnorodności repertuaru receptorów T (spektrotyp TCR) może być wzbogacone o podanie liczby sjTREC [26, 27]. Taalvensari i wsp. wykazali, że liczba sjTREC po przeszczepie ściśle korelowała z liczbą komórek dziewiczych oraz z poliklonalnym repertuarem TCR [28]. Wiek pacjenta, obecność cGVHD, usuwanie limfocytów T z materiału przeszczepowego i zastosowanie terapii z udziałem Campath sprzyjają obniżeniu liczby sjTREC [29]. Badania własne potwierdzają niektóre z tych zależności. Badana grupa pacjentów

z przewlekłą białaczką szpikową (CML) wykazała, że większą liczbę sJTREC mają biorcy HCT, u których nie rozwinęła się postać przewlekła GVHD oraz gdy biorcy byli wolni od wznowy choroby podstawowej [25]. Większą liczbę sJTREC posiadali pacjenci, których proporcje komórek o fenotypie komórek naiwnych w porównaniu do komórek pamięci/efektorowych były wyższe. U wszystkich pacjentów sJTREC(-) zaobserwowano wystąpienie ostrej postaci GVHD II-III stopnia. Ponadto w kolejnym doniesieniu udokumentowano, że u pacjentów z CML, u których stwierdzono obecność transkryptu BCR-ABL nie stwierdzono obecności sJTREC [30].

## 10.6. Liczba TREC u pacjentów z nabytymi niedoborami odporności oraz z chorobami o podłożu autoimmunologicznym

Obniżenie odporności wywołane obecnością wirusa ludzkiego niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV) wymaga wielolekowej terapii opartej na użyciu swoistych inhibitorów enzymów wirusowych HAART (ang. *highly active antiretroviral treatment*). Terapia zapewnia przywrócenie właściwej proporcji CD4/CD8 oraz pojawienia się swoistych wobec HIV limfocytów komórek CD4+. Uzasadnionym w prowadzeniu terapii HAART jest monitorowanie prawidłowej funkcji grasicy poprzez analizę liczby TREC przed wdrożeniem terapii, a także po jej zakończeniu [9]. Badanie liczby TREC stosowane jest również w nabytych niedoborach odporności CVID [12]. Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko własnym tkankom i narządom, u podłoża której leży antygen własny postrzegany jako obcy determinuje rozwój chorób autoimmunologicznych swoistych narządowo lub o charakterze wielonarządowym. Zaserwowano, iż pacjenci, u których rozwija się toczeń rumieniowaty trzewny (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE) charakteryzowali się obniżoną liczbą TREC we frakcji komórek jednojądrzastych. Sugeruje to, że obniżona liczba TREC może być spowodowana wytwarzaniem niewielkiej liczby komórek opuszczających grasicę (RTE) lub nadmiernym wzrostem proliferacji limfocytów obwodowych. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RA) zaobserwowano, że różnorodność repertuaru TCR była zubożona czemu towarzyszyła zmniejszona liczba TREC [31].

## 10.7. Inwolucja grasicy a liczba TREC

Inwolucja grasicy jest procesem polegającym na redukcji czynnościowej narządu związanej z upływem wieku. W wyniku tego procesu dochodzi do morfologicznych zmian struktury narządu, obserwuje się zmniejszenie masy grasicy i powiększenie proporcji przestrzeni okołonaczyniowych objętych rozrostem tkanki tłuszczowej w stosunku do nabłonka-epitelium. Obszary limfo-epitelialne są zastępowane przez tkankę tłuszczową łączną oraz przez przestrzenie okołonaczyniowe. Mimo stopniowej inwolucji obszary nabłonkowe są wciąż obecne i wraz

## 10. Liczba TREC jako marker diagnostyczny limfopoezy

z upływem czasu proces tymopoezy nie wygasza się całkowicie, a zostaje znacznie zredukowany. Bezpośrednim następstwem zmniejszenia się masy grasicy jest spadek całkowitej liczby tymocytów dojrzewających w kierunku limfocytów T. Ten fizjologiczny proces w naturalny sposób związany jest ze starzeniem się organizmu, podlega regulacji hormonalnej i związany jest ze skracaniem się telomerów. Analiza TREC w różnych grupach wiekowych wskazuje na znaczny spadek ich liczby i odwrotną korelację u osób młodych i w podeszłym wieku [13, 32].

## 10.8. Podsumowanie

Episomalne cząsteczki DNA - TREC jako stały element komórki dziewiczej stanowią dogodny marker odzwierciedlający prawidłową funkcję grasicy. Pomiar liczby TREC stanowi pomocne narzędzie diagnostyczne w ocenie zaburzonego procesu limfopoezy w wielu sytuacjach klinicznych. Wykonanie tego oznaczenia jest szczególnym wskazaniem do badań pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności podczas rozpoznania, u pacjentów po alogenicznym przeszczepie, oraz u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi. Zastosowanie techniki qPCR pozwala na wdrożenie nowego panelu diagnostycznego we wskazanych sytuacjach klinicznych [33, 34].

## Literatura

- [1] Holländerer G.A., Krenger W., Blazar B.R.: Emerging strategies to boost thymic function. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010; 10: 443–453
- [2] Clave E., Busson M., Douay C. i wsp.: Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2009; 113: 6477–6484
- [3] Shono Y., Ueha S., Wang Y. i wsp.: Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2010; 115: 5401–5411
- [4] Wils E.J., van der Holt B., Broers A.E. i wsp.: Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*, 2011; 96: 1846–54
- [5] Buckley R.H., Schiff S.E., Schiff R.I. i wsp.: Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, 1999; 340: 508–516
- [6] Sarzotti M., Patel D.D., Li X. i wsp.: T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J. Immunol.*, 2003; 170: 2711–2718
- [7] Borghans J.A., Bredius R.G., Hazenberg M.D., i wsp.: Early determinants of long-term T cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Blood*, 2006; 108: 763–769
- [8] Saitoh A., Singh K.K., Sandall S., i wsp.: Association of CD4+ T-lymphocyte counts and new thymic emigrants in HIV-infected children during successful highly active antiretroviral therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 909–915

- [9] Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H. i wsp.: Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.*, 1998; 396: 690–695
- [10] Dion M.L., Sekaly R.P., Cheynier R.: Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol. Biol.*, 2007; 380: 197–213
- [11] Krenger W., Blazar B.R., Holländer G.A.: Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood.*, 2011; 117: 6768–6776
- [12] Somech R.: T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.*, 2011; 11: 517–524
- [13] Lynch H.E., Goldberg G.L., Chidgey A. i wsp.: Thymic involution and immune reconstitution. *Trends. Immunol.*, 2009; 30: 366–373
- [14] Krenger W., Holländer G.A.: The role of the thymus in allogeneic haematopoietic stem cell Transplantation. *Swiss Medical Weekly* 2010; 41: 1-11
- [15] Toubert A., Glauzy S., Douay C., Clave E.: Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens.*, 2012; 79: 83–89
- [16] Lorenzi A.R., Patterson A.M., Pratt A. i wsp.: Determination of thymic function directly from peripheral blood: a validated modification to an established method. *J Immunol. Methods.*, 2008; 339: 185-194
- [17] Hazenberg M.D., Verschuren M.C., Hamann D., i wsp.: T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.*, 2001; 79: 631–640
- [18] Chen X., Barfield R., Benaim E., i wsp.: Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood.*, 2005; 105: 886–893
- [19] Cavazzana-Calvo M., Carlier F., Le Deist F. i wsp.: Long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation in primary T-cell-immunodeficient patients is associated with myeloid chimerism and possibly the primary disease phenotype. *Blood.*, 2007; 109: 4575–4581
- [20] Wysoczańska B., Wolska B., Dłubek D., i wsp.: Complete chimerism in CD3+ population, in spite of mixed chimerism in whole blood cells, associates with T-cells reconstitution and the presence of TREC in PBMNC in children with SCID after HSCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2006; 37(Suppl.1): S201
- [21] Borte S., Ulrika von Döbeln U., Fasth A., i wsp.: Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood.*, 2012; 119: 2552-2555
- [22] Brown L., Xu-Bayford J., Allwood Z., i wsp.: Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood.*, 2011; 117: 3243–3246
- [23] Wu C.J., Chillemi A., Alyea E.P. i wsp.: Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood.*, 2000; 95: 352–359
- [24] Weinberg K., Blazar B.R., Wagner J.E., i wsp.: Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2001; 97: 1458–1466
- [25] Wysoczanska B., Bogunia-Kubik K., Dłubek D., i wsp.: Association with the presence of naive T cells in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic human stem cell transplantation and the lower incidence of chronic graft-versus host disease and relapse. *Transplant. Proc.*, 2007; 39: 2898–2901

## 10. Liczba TREC jako marker diagnostyczny limfopoezy

- [26] Bahceci E., Epperson D., Douek D.C., i wsp.: Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism. *Br. J. Haematol.*, 2003; 122: 934–943
- [27] Poulin J.F., Sylvestre M., Champagne P., i wsp.: Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood.*, 2003; 102: 4600–4607
- [28] Talvensaari K., Clave E., Douay C., i wsp.: A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood.*, 2002; 99: 1458–1464
- [29] Fallen P.R., McGreavey L., Madrigal J.A., i wsp.: Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.*, 2003; 32: 1001–1014
- [30] Przybylski G.K., Kreuzer K.A., Siegert W., Schmidt C.A.: No recovery of T-cell receptor excision circles (TRECs) after non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is correlated with the onset of GvHD. *J. Appl. Genet.*, 2007; 48: 397–404
- [31] De Vera M.J., Al-Harhi L., Gewurz A.T.: Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, 2004; 93: 478–484
- [32] Pujol-Borrell R., Herrero-Mata M.J., Palou E., Armengol M.P.: Immunological senescence and thymic function in transplantation. *Transplantation.*, 2009; 88: 8–13
- [33] Clave E., Rocha V., Talvensaari K., i wsp.: Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.*, 2005; 105: 2608–2613
- [34] Wysoczanska B.: T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) as a marker of thymic function. *Postępy. Hig. Med. Dosw.* 2008; 62: 708-724

# ASOCJACJE HLA Z WYBRANYMI JEDNOSTKAMI CHOROBYMI

Monika Mordak<sup>1</sup>, Marzena Lenart<sup>1,2</sup>, Rafał Szatanek<sup>1,2</sup>,  
Monika Baj-Krzyworzeka<sup>1,2</sup>, Kazimierz Węglarczyk<sup>1,2</sup>, Maciej Siedlar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w  
Krakowie*

<sup>2</sup>*Zakład Immunologii Klinicznej, Katedra Immunologii Klinicznej  
i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego,  
Kraków*

## Streszczenie

Występowanie niektórych cząsteczek HLA związane jest ze zwiększonym lub zmniejszonym ryzykiem rozwoju chorób. Mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska nie są do końca jasne, a dwie najbardziej prawdopodobne teorie oparte są o hipotezę molekularnej mimikry oraz nieskutecznej selekcji limfocytów T w grasicy. Dotychczas udokumentowano asocjacje cząsteczek HLA z chorobami o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnym oraz infekcyjnym. Przykłady chorób o opisanym, diagnostycznie istotnym związku z HLA zostały przedstawione wraz z względnym ryzykiem ich wystąpienia.

*Słowa kluczowe:* zgodności tkankowej HLA, asocjacje, autoimmunizacja

### 11.1. Wstęp

Cząsteczki układu HLA (ang. *human leukocyte antigens*) odgrywają kluczową rolę w procesie prezentacji antygenów odpowiednim komórkom immunokompetentnym, co skutkuje aktywacją odpowiedzi immunologicznej (humoralnej i komórkowej) organizmu. Typowanie (oznaczanie) HLA wykonywane jest rutynowo przed przeszczepami narządowymi oraz komórek macierzystych celem optymalizacji doboru dawca-biorca przeszczepu. Oprócz zastosowania w transplantologii, oznaczanie HLA coraz częściej wykonywane jest w wybranych jednostkach chorobowych, w których HLA są traktowane jako „markery” stanów podatności lub rzadziej oporności na rozwój choroby. Istnieje bowiem udokumentowany związek między ekspresją niektórych antygenów/alleli HLA i częstości występowania chorób, głównie o charakterze autoimmunizacyjnym. Przyczyna tego zjawiska nie jest jasna, ale wiadomo, że sama ekspresja cząsteczek HLA nie



## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

jest przyczyną choroby, a jedynie może być czynnikiem sprzyjającym jej rozwojowi [1].

Postuluje się kilka mechanizmów tłumaczących związek HLA z chorobami autoimmunizacyjnymi. Jednym z nich jest tzw. hipoteza „molekularnej mimikry” polegająca na reakcji krzyżowej pomiędzy prezentowanymi peptydami bakteryjnymi lub wirusowymi, a antygenami własnymi, prowadzącej do powstania autoreaktywnych klonów limfocytów T i/lub B. Należy podkreślić, że tylko w niewielu jednostkach chorobowych udało się wykazać rolę czynnika infekcyjnego w zapoczątkowaniu choroby (np. gorączka reumatyczna po zakażeniu wybranymi typami  $\beta$ -hemolizującego paciorkowca grupy A). Innym prawdopodobnym mechanizmem, dzięki któremu określone antygeny HLA predysponują do rozwoju choroby, jest wpływ własnych peptydów prezentowanych przez konkretne cząsteczki HLA na rozwój i selekcję takiego repertuaru limfocytów T w grasicy, który jest reaktywny względem autoantygenów. Wspomniane autogenne peptydy mogą ulegać ekspresji w zbyt niskim stężeniu, lub wiązać się ze zbyt niskim powinowactwem do własnych cząsteczek HLA, by mediować selekcję negatywną autoreaktywnych limfocytów T. Zastanawiający jest fakt przetrwania konkretnych genów kodujących antygeny HLA predysponujące do rozwoju choroby w populacji i brak ich eliminacji na drodze selekcji naturalnej. Wytłumaczeniem tego zjawiska wydają się być przykłady udziału repertuaru genów HLA związanych z rozwojem choroby w ochronie przed wystąpieniem innych, niekiedy groźniejszych lub częstszych w danym środowisku chorób.

Zależność między HLA a chorobami wykazano w statystycznych badaniach populacyjnych i rodzinnych, jak również środowiskowych, które uwzględniały częstości występowania określonych cząsteczek HLA w zależności od położenia geograficznego, rasy i płci. W badaniach populacyjnych porównuje się częstość występowania alleli/antygenów HLA w grupie chorych z częstością występowania tej choroby w populacji ludzi zdrowych i określa tzw. iloraz szans (OR czyli ang. *odds ratio*), w wielu przypadkach utożsamiany ze względным ryzykiem (RR, ang. *relative risk*) wystąpienia choroby, obliczany wg wzoru:

$$RR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c} \quad (11.1)$$

gdzie  $a$ - to liczba chorych z danym antygenem/allelelem HLA,  $b$ - liczba chorych bez danego antygeny/allelu HLA,  $c$ - liczba zdrowych z danym antygenem/allelelem HLA,  $d$ -liczba zdrowych bez danego antygeny/allelu HLA [2].

Określając prawdopodobieństwo wystąpienia choroby skojarzonej z HLA należy brać pod uwagę również czynniki pozagenetyczne, np. epigenetyczne czy socjoekonomiczne.

Typowanie HLA może być pomocne w prognozowaniu skłonności (predyspozycji genetycznej) do wystąpienia pewnych chorób, dynamiki postępu choroby, jak również definiowaniu klinicznych typów choroby. Rozwój metod oznaczania HLA, w szczególności przejście od metod serologicznych do technik molekularnych, umożliwił określenie konkretnych alleli i grup allelicznych („podtypów” HLA) związanych z występowaniem wybranych jednostek chorobowych, a co za tym idzie, szybszą i pełniejszą ich diagnostykę.

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują, że większość chorób wykazujących asocjacje z HLA to choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnym, natomiast znacznie rzadziej są to choroby zakaźne i nowotworowe. Poniżej przedstawiono opis chorób o podłożu autoimmunizacyjnym i zapalnym, w których związek z HLA jest udokumentowany i istotny diagnostycznie.

## 11.2. Choroby reumatyczne

### 11.2.1. Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa

Szacuje się, iż zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) występuje u 0,2-0,9% przedstawicieli rasy kaukaskiej [3]. Jest to przewlekła, postępująca choroba dotycząca tkanki łącznej lokalizująca się przede wszystkim w drobnych stawach międzykręgowych, więzadłach międzykręgowych oraz stawach krzyżowo-biodrowych. Związana jest prawdopodobnie z zaburzeniami immunoregulacyjnych mechanizmów dotyczących syntezy określonych cytokin i prowadzi do stopniowego zesztywnienia oraz osteoporozy. ZZSK występuje 2-3 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet [4]. Antygenem kojarzonym z występowaniem ZZSK jest HLA-B27. Jego obecność u danej osoby zwiększa ryzyko wystąpienia ZZSK 90-krotnie. Metody diagnostyczne umożliwiają oznaczanie obecności antygenu HLA-B27 zarówno w postaci białka (serologia, cytometria przepływowa) jak i w formie określonego genu (testy oparte na technice PCR). Metody serologiczne lub cytofluorymetryczne są badaniami przesiewowymi, wskazującymi na obecność antygeny, ale nie konkretnego allelu kodującego produkt białkowy. Testy molekularne pozwalają na identyfikację konkretnego allelu HLA-B\*27, co w przypadku ZZSK jest niezwykle istotne gdyż allele HLA-B\*27:06 [5,6] i HLA-B\*27:09 [6] nie korelują z występowaniem ZZSK. Zaznacza się również, iż ustalenie obecności HLA-B27 nie jest równoznaczne z diagnozą ZZSK, a jest jedynie badaniem pomocniczym, które wskazuje na zwiększone ryzyko wystąpienia tej choroby.

### 11.2.2. Reumatoidalne zapalenie stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) charakteryzuje się nieswoistym zapaleniem stawów, zmianami pozastawowymi oraz powikłaniami układowymi [7]. Następstwem nacieków limfocytów oraz komórek plazmatycznych błony maziowej stawów jest proces zapalny, w wyniku którego dochodzi do jej obrzęku oraz rozrostu z następującą destrukcją i ograniczeniem ruchliwości stawów [7]. Okazuje się, iż z występowaniem RZS koreluje HLA-DR4. Dane statystyczne wskazują, iż obecność tego antygeny zwiększa ryzyko wystąpienia tej choroby blisko 4-krotnie. W przypadku RZS szczególnie istotne wydają się być allele HLA-DRB1\*04:01/04/05/08, a także HLA-DRB1\*01:01 i 14:02 [8]. Natomiast obecność HLA-DRB1\*04:02 wydaje się zmniejszać ryzyko jej rozwoju [10]. W łańcuchach  $\beta$  kodowanych przez allel HLA-DRB1\*04:02 w pozycji 71, która współtworzy kieszonkę czwartą w rowku cząsteczki HLA-DR, występuje kwas glutaminowy o ładunku ujemny, w przeciwieństwie do pozostałych alleli, gdzie kodowana jest arginina wykazująca ładunek dodatni [9]. Następstwem różnicy ładunku może być

## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

skłonność cząsteczki HLA-DR kodowanej przez allele promujące RZS do prezentacji autoantygenu limfocytom Th, w wyniku czego może dochodzić do rozwoju choroby [9].

### 11.2.3. Reaktywne zapalenie stawów (Zespół Reitera)

Zespół Reitera (ZR) jest to najczęściej asymetryczne, jałowe zapalenie kilku stawów oraz przyczepów ścięgniastych poprzedzone zakażeniem narządów płciowych (zwykle atypowym) lub przewodu pokarmowego (zwykle pałeczkami jelitowymi *Enterobacteriaceae*) [10]. Obecność HLA-B27 u chorego zwiększa ryzyko wystąpienia ZR w następstwie przebiecia zapalenia cewki moczowej 36-krotnie.

## 11.3. Choroby układu pokarmowego

### 11.3.1. Autoimmunologiczne zapalenie błony śluzowej żołądka

Autoimmunologiczne zapalenie błony śluzowej żołądka (ang. *autoimmune gastritis*, AIG) należy do grupy schorzeń autoimmunizacyjnych narządowoswoistych. We krwi chorych na AIG stwierdza się obecność autoprzeciwciał przeciwko czynnikowi wewnętrznemu (ang. *intrinsic factor antibody*, IFA) oraz przeciwko komórkom okładzinowym żołądka (ang. *parietal cell autoantibody*, PCA). Reakcje zapalne związane z obecnością przeciwciał prowadzą do zaniku błony śluzowej, głównie w obrębie trzonu żołądka. W przypadku chorych z AIG wykazano zwiększoną częstość występowania określonych HLA klasy II: HLA-DRB1\*04 oraz HLA-DQB1\*03, co potwierdza podłoże genetyczne omawianych schorzeń i wskazuje na ich powiązanie z antygenami układu HLA [11].

### 11.3.2. Nieswoiste choroby zapalne jelit

Nieswoiste choroby zapalne jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD) stanowią niejednorodną grupę przewlekłych schorzeń o zbliżonych objawach klinicznych i patogenezie. Częstość występowania IBD w krajach europejskich wynosi około 1,0-2,0%. W obrębie IBD wyróżnia się chorobę Leśniowskiego-Crohn'a (*Crohn's disease*, CD), wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa*, CU) oraz niespecyficzne zapalenie jelit (*colitis nonspecifica*, CN). Najczęściej występującymi typami IBD są CD i CU. Formy niespecyficzne diagnozowane są w około 15% przypadków [12]. IBD cechuje przewlekły proces zapalny. W przypadku CD zlokalizowany jest on najczęściej w obrębie końcowej części jelita cienkiego oraz okrężnicy, chociaż proces chorobowy może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego. W przypadku UC stan zapalny dotyczy jelita grubego, jednakże ogniskowe zmiany zapalne mogą obejmować również pozostałe odcinki przewodu pokarmowego [13]. Etiopatogeneza IBD jest złożona i nie do końca poznana. Wskazuje na udział wielu czynników m.in. o podłożu immunologicznym, genetycznym, środowiskowym oraz mikrobiologicznym. Znaczący udział w powstawaniu procesu zapalnego przypisywany jest zaburzeniom immunologicznym, polegającym na wzmożonej aktywacji limfocytów T CD4+, zwiększonej produkcji cytokin i/lub zaburzeniami dotyczącymi procesów autofagocytozy.

W etiopatogenezie IBD podkreśla się udział predyspozycji genetycznych, prowadzących do nadmiernie nasilonej reakcji immunologicznej na niezidentyfikowane czynniki środowiskowe [14] oraz asocjacje pomiędzy czynnikami genetycznymi i florą bakteryjną. Znaczącą rolę czynników genetycznych w patogenezie nieswoistych schorzeń jelit potwierdzają różnice etniczne (zwiększona częstość tych chorób u osobników rasy kaukaskiej oraz narodowości żydowskiej), rodzinne występowanie oraz zwiększony odsetek IBD u bliźniąt jednojajowych [15]. Przeprowadzone badania wykazały udział w etiopatogenezie IBD licznych genów, zlokalizowanych w tzw. rejonach IBD1-IBD9. Spośród nich największe znaczenie przypisuje się genom należącym do układu zgodności tkankowej HLA klasy II oraz NOD2 (ang. *nucleotide oligomerization domain*) zlokalizowanym w tzw. rejonie IBD3 (6p13). Mutacje genu NOD2 wiążą się z powstawianiem CD, natomiast określone allele HLA powiązane są zarówno z CD jak i UC [14].

Zarówno w przypadku CD jak i UC wykazano asocjacje przede wszystkim z HLA klasy II (głównie HLA-DR). W przypadku CD najsilniejszy związek z powstawianiem choroby wykazano dla alleli grupy HLA-DRB1\*07. Częstość występowania HLA-DRB1\*07 waha się od 5% do 29% wśród Europejczyków i mieszkańców Ameryki Północnej oraz zaledwie 1% u Japończyków, u których powyższej asocjacji nie zaobserwowano. Silne powiązanie z UC potwierdzono w przypadku występowania alleli: HLA-DRB1\*15:02, HLA-DRB1\*12, HLA-DRB1\*09 i HLA-DRB1\*02 oraz haplotypów DRB1\*0103-DQB1\*03:01 i DRB1\*01:03-DQB1\*05:01 [16–18]. Warto zaznaczyć, że antygen HLA-DRB1\*04 wykazuje dodatnią asocjację z CD, natomiast negatywną w przypadku UC [18, 19].

Jedną z cech IBD jest występowanie w przebiegu tych schorzeń tzw. objawów pozajelitowych. Dotyczą one około 25-35% pacjentów, częściej pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Mogą to być choroby mające wspólną patogenezę ze stanem zapalnym jelit np. zapalenie stawów, rumień guzowaty, zapalenie tęczy i spojówek. Objawy pozajelitowe mogą przebiegać także w postaci chorób autoimmunizacyjnych, takich jak ZZSK, pierwotna marskość żółciowa wątroby, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, choroby autoimmunizacyjne tarczycy, anemia hemolityczna. W przypadku objawów pozajelitowych również wykazano asocjacje z antygenami układu HLA. U chorych z CD pojawiają się one częściej w połączeniu z antygenami: HLA-A2, HLA-DR1 i HLA-DQ5. Częstsze zmiany w narządach u osób z UC zaobserwowano w przypadku współwystępowania HLA-DRB1\*01:03, HLA-B\*27 i HLA-B\*58.

### 11.3.3. Celiakia

Celiakia nazywana także chorobą trzewną jest jedyną chorobą autoimmunizacyjną o poznanej etiologii i silnych asocjacjach z ekspresją antygenów HLA. Powstanie choroby związane jest z wystąpieniem nieprawidłowej reakcji na gliadynę (składowa glutenu) zawartą w diecie. W obrębie jelita deaminowane peptydy glutenu rozpoznawane są przez komórki prezentujące antygen i wiązane przez cząsteczki DQ2 lub DQ8 układu HLA. Prowadzi to do powstania, indukowanego przez limfocyty T CD4+, przewlekłego stanu zapalnego w obrębie jelita cienkiego. Utrzymujący się stan zapalny prowadzi do atrofii kosmków błony śluzowej.

## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

zowej jelita cienkiego i w konsekwencji do objawów klinicznych tj. biegunki, bólów brzucha, utraty masy ciała lub innych, związanych głównie z zaburzeniami wchłaniania. Jedynym znanym sposobem leczenia celiakii jest całkowite wyeliminowanie z diety produktów zawierających gluten. Mimo, że celiakia jest jedną z najczęstszych (w populacji kaukaskiej 1:100-1:300) chorób autoimmunizacyjnych w krajach europejskich większość chorych pozostaje niezdiagnozowana. Diagnostyka serologiczna celiakii jest badaniem nieinwazyjnym i polega na stwierdzeniu obecności w surowicy pacjenta przeciwciał przeciwko endomysium i transglutaminazie tkankowej. Pomimo, że badania serologiczne cechują się wysoką swoistością oraz czułością, złotym standardem w rozpoznawaniu choroby trzewnej pozostaje nadal stwierdzenie w biopsji jelita cienkiego charakterystycznych zmian histologicznych wg skali Marsha. Utrudniona diagnostyka choroby trzewnej związana jest z częstym występowaniem form atypowych, bez konwencjonalnych objawów klinicznych i obecności markerów serologicznych [20]. W związku z tym współczesna diagnostyka celiakii powinna się opierać nie tylko na wynikach biopsji jelita, ale także na analizie obrazu klinicznego, wywiadzie rodzinnym, obecności specyficznych autoprzeciwciał oraz na typowaniu HLA. Choroba jest kojarzona z ekspresją HLA-DQ2 i HLA-DQ8. Badania wskazują, że zdecydowana większość pacjentów (95%) wykazuje ekspresję HLA-DQ2, a pozostałe 5% pacjentów ekspresję cząsteczki HLA-DQ8 (DQA1\*03 DQB1\*03:02). Występujący u zdecydowanej większości pacjentów antygen DQ2 może występować w dwóch postaciach (isoformach): *cis* lub *trans*. Genotyp DQ2 *cis*, nazywany DQ2.5, kodowany jest przez allele DQA1\*05:01 i DQB1\*02:01. Jest on charakterystyczny dla ludności centralnej i północnej Europy, wskazuje na ryzyko wystąpienia celiakii. W krajach śródziemnomorskich przeważa natomiast forma HLA DQ2 *trans* kodowana przez allele DQA1\*02:01 i DQB1\*02:02 czyli genotyp DQ2.2. Należy zaznaczyć, że występowanie genotypu DQ2.2 bez równoczesnej obecności genotypu DQ2.5 lub DQ7 (DQA1\*05:05 i DQB1\*03:01) lub DQ8 (DQA1\*03 i DQB1\*03:02) pozwala na wykluczenie celiakii. Forma *cis* wykazuje asocjację z HLA-DRB1\*03. Dla postaci *trans* charakterystyczna jest obecność HLA-DRB1\*05 lub HLA-DRB1\*07. HLA-DQ8 występuje najczęściej z HLA-DRB1\*04 (Tabela 11.1). Reasumując, genotypy DQ2.2/DQ2.5, DQ2.2/DQ7, DQ2.5/x, DQ8/x (gdzie x oznacza dowolny haplotyp) związane są z ryzykiem wystąpienia celiakii, które jest największe u homozygot DQ2.5/DQ2.5. Zaznaczyć należy, że ekspresja antygenów HLA-DQ2 i/lub DQ8 w całej populacji sięga blisko 30%, co oznacza, że sama obecność w/w antygenów jest niezbędną, ale niewystarczającą do rozwoju choroby. Obecność powyższych antygenów powoduje zwiększenie ryzyka wystąpienia choroby 80-krotnie. Do tej pory udało się zidentyfikować ponad 30 genów nie należących do układu HLA (np. ATXN2, TLR8, PARK7), które także zwiększają ryzyko wystąpienia celiakii [21].

Typowanie HLA jest szczególnie przydatne w przypadku diagnostyki nietypowych postaci celiakii oraz w przypadku niejednoznacznego wyniku badania histologicznego. Jedynie około 0,5% osób chorych na celiakię wykazuje brak obecności HLA-DQ2 i/lub HLA-DQ8, stąd ujemna wartość predykcyjna testu jest bliska 100% [22], a w praktyce eliminuje konieczność dalszych badań. Typo-

#### 11.4. Udokumentowana rola antygenów HLA w innych jednostkach chorobowych

Tabela 11.1: Genotypy HLA związane z wystąpieniem choroby trzewnej.

Genotyp związany z wystąpieniem celiakii	isoforma	Genotyp
DQA1*05:01 - DQB1*02:01 – DRB1*03	DQ2 <i>cis</i>	DQ2.5
DQA1*05:05 - DQB1*03:01 – DRB1*11 DQA1*02:01 - DQB1*02:02 – DRB1*07	DQ2 <i>trans</i>	DQ2.2/DQ7.5
DQA1*05:05 - DQB1*03:01 – DRB1*12 DQA1*02:01 - DQB1*02:02 – DRB1*07	DQ2 <i>trans</i>	DQ2.2/DQ7.5
DQA1*03:01/02 - DQB1*03:02 – DRB1*04	DQ8	DQ8

wanie HLA jest przydatne u osób z tzw. grup ryzyka, a więc krewnych pierwszego stopnia oraz chorych posiadających schorzenia często współistniejące z celiakią (m.in. autoimmunizacyjne choroby tarczycy, zespół jelita drażliwego, cukrzyca typu 1). Typowanie HLA może w tych przypadkach służyć jako narzędzie praktycznie wykluczające możliwość rozwoju celiakii, a celna i szybka diagnoza umożliwia odpowiednio wczesne wprowadzenie diety bezglutenowej, co zapobiega nasileniu zmian atroficznych w obrębie jelita. Również w przypadku chorych, u których niemożliwa jest biopsja jelita, oznaczenie obecności antygenów HLA-DQ2/HLA-DQ8 jest rekomendowane w celu pełniejszej diagnostyki.

### 11.4. Udokumentowana rola antygenów HLA w innych jednostkach chorobowych

#### 11.4.1. Łuszczyca

Łuszczyca to przewlekła, nawracająca choroba, z kręgu chorób reumatycznych, która charakteryzuje się przede wszystkim występowaniem na skórze łuszczących się zmian i/lub zapalnymi zmianami stawowymi. Jest to choroba dziedziczna, w patogenezie której wykazano związek z antygenami HLA. Występowanie konkretnych antygenów HLA u pacjentów z łuszczycą opisano już w latach 70-tych ubiegłego stulecia, kiedy jeszcze jedynymi znanymi metodami ich oznaczania były metody serologiczne. Wskazano wtedy na szczególny udział antygenów HLA-B17, HLA-B13, HLA-Cw6 oraz HLA-DR7 w rozwoju schorzenia u osób rasy kaukaskiej [23]. Forma łuszczycy o wczesnym początku (przed 40-tym rokiem życia) wykazuje wysoką asocjacje z HLA-Cw6 (35-krotnie wyższe ryzyko), podczas gdy ten związek u pacjentów z późno ujawniającą się chorobą jest znacznie słabszy. Wprowadzenie w latach 90-tych metod molekularnych typowania HLA umożliwiło opisanie rozszerzonego haplotypu HLA-DRB1\*07:01/02, DQA1\*02:01 oraz DQB1\*03:03 u pacjentów z łuszczycą o wczesnym początku [24]. W badaniach analizujących związek HLA klasy I stwierdzono zwiększony odsetek występowania HLA-Cw6, szczególnie allelu HLA-C\*06:02, także w badaniach prowadzonych w populacji polskiej [25, 26]. Antygen ten wydaje się mieć szczególnie związek z rozwojem i nasileniem choroby u młodszych pacjentów, szczególnie u tych, którzy nie skończyli 20-go roku życia, oraz z łuszczycą w wywiadzie ro-

## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

dzinnym. Inne doniesienia wskazują także na związek wspomnianego wcześniej rozszerzonego haplotypu w obrębie HLA klasy II z rozwojem choroby, zwracając szczególną uwagę na rolę HLA-DRB1\*07:01 [27].

### 11.4.2. Narkolepsja

Związek konkretnych antygenów HLA, tj. HLA-DR2 i HLA-DQ1, z narkolepsją opisano już prawie 30 lat temu. Co ciekawe, jest to jedna z chorób w których nie wykazano współistnienia stanu zapalnego. Obecnie, we wszystkich grupach etnicznych, szczególną rolę przypisuje się allelowi HLA-DQB1\*06:02. Allel ten obecny jest u 12-38% ogólnej populacji ludzkiej, podczas gdy u pacjentów z narkolepsją allel ten obecny jest u 85% z nich, często w kombinacji z allelem HLA-DRB1\*15:01 [28]. Ponadto, allel DQB1\*06:02 sam, szczególnie występując w wersji homozygotycznej, uznawany jest jako główny allel podatności na rozwój narkolepsji - ryzyko rozwoju narkolepsji w przypadku obecności allelu DQB1\*06:02 w formie homozygotycznej jest 2 do 3-krotnie wyższe niż w przypadku heterozygot [29]. Jednocześnie, opisano także allele antygenów HLA, których obecność wydaje się mieć działanie chroniące przed rozwojem narkolepsji, w tym DQB1\*06:01, DQB1\*05:01 oraz DQA1\*01 [29].

### 11.4.3. Sarkoidoza

Sarkoidoza jest chorobą systemową charakteryzującą się powstawaniem ziarniników, które nie podlegają martwicy. Sarkoidoza może objąć każdy narząd, choć najczęściej ziarniniki pojawiają się w węzłach chłonnych i płucach. Etiologia choroby jest nieznaną, ale nie wyklucza się przyczyn infekcyjnych. Opisano również związek HLA-B7 i HLA-B8 z jej rozwojem. Antygen B7 obecny jest w znacznym odsetku w populacjach o wysokiej częstości występowania sarkoidozy, natomiast obecność HLA-B8 koreluje z ostrym i krótkim przebiegiem choroby, niezależnie od populacji badanej [30]. Dalsze badania wyróżniły haplotyp o wysokim ryzyku wystąpienia sarkoidozy u osób rasy kaukaskiej (HLA-B8-DR3), sugerując tym samym możliwą korelację sarkoidozy z HLA klasy II [31]. Obserwacja ta potwierdzałaby hipotezę o mediowaniu rozwoju choroby przez antygeny zewnętrzne. Jednakże, asocjacje poszczególnych antygenów HLA klasy II z rozwojem sarkoidozy znacznie różnią się zależnie od badanej populacji. Dla przykładu, opisano związek alleli grupy HLA-DRB1\*15 i DQB1\*06:02 z przewlekłą postacią choroby, a DRB1\*03 i DQB1\*02:01 z jej łagodną postacią w populacji skandynawskiej [32]. Natomiast, w populacji japońskiej, za antygeny wyższego ryzyka rozwoju choroby uznano HLA-DR5, HLA-DR6, HLA-DR8 oraz HLA-DR9 [33]. Opisano także, w populacji skandynawskiej, związek antygeny HLA-DR17 z ostrą postacią choroby, natomiast obecność HLA-DR14 i HLA-DR15 z jej przewlekłą formą [34]. W wielu badanych populacjach, w tym w polskiej, za antygeny HLA chroniące przed rozwojem sarkoidozy uznano HLA-DR1 i HLA-DR4 [35]. Spośród antygenów DQ, za największy czynnik ryzyka uważa się allele HLA-DQB1\*06:01/02, zależnie od badanej populacji, oraz allel DQB1\*02:01. Allel DQB1\*06:01 korelowano także z postacią sarkoidozy z zajęciem serca, a allel

DQB1\*02:01, wraz z DRB1\*03:01 – z postacią ostrą choroby, nazywaną także zespołem Löfgrena [30, 32].

#### 11.4.4. Cukrzyca typu I

Cukrzyca typu I, nazywana też cukrzycą insulinozależną, jest jedną z etiopatogenetycznych postaci cukrzycy. Jest to choroba autoimmunizacyjna, w której dochodzi do powolnego niszczenia komórek  $\beta$  wysp trzustkowych i w następstwie tego, do utraty zdolności wydzielania insuliny. Najsilniejszą asocjację pomiędzy ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu I, a obecnością konkretnych HLA obserwuje się w obrębie *loci* DRB1-DQA1-DQB1. Największym ryzykiem cechuje się występowanie specyficznego heterozygotycznego genotypu, składającego się z alleli HLA-DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02 na jednym chromosomie oraz DRB1\*04:01/02/04/05/08-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02/04 (lub DQB1\*02) na drugim. Genotyp ten w skrócie określa się mianem „DR3/DR4” [34]. Opisano, że obecność alleli DRB1\*04:01 i DQB1\*03:02 zwiększa ryzyko wystąpienia cukrzycy typu I aż 8,5-krotnie. Ponadto, już wczesne doniesienia z lat 80-tych ubiegłego wieku wskazywały, że obecności antygeny DQ8 (DQB1\*03:02) bądź DQ7 (DQB1\*03:01), w obrębie haplotypu DR4, pozwalają na rozróżnienie serotypu DR4 o odpowiednio wysokim lub niskim poziomie ryzyka – w przypadku występowania antygeny DQ7 względne ryzyko wystąpienia choroby jest równe 1 [35]. Znane są także antygeny HLA wykazujące silne działanie ochronne przed rozwojem cukrzycy typu I. Najlepszym przykładem jest haplotyp HLA-DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 [36]. Do innych haplotypów, także o działaniu ochronnym, należą: DRB1\*04:03-DQB1\*03:02, HLA-DRB1\*11:04-DQA1\*05:01-DQB1\*03:01, DRB1\*07:01-DQA1\*02:01-DQB1\*03:03 oraz HLA-DRB1\*14:01-DQA1\*01:01-DQB1\*05:03 [34].

W przypadku cukrzycy insulinozależnej (typu II) nie stwierdzono dotychczas korelacji między ryzykiem rozwoju tej choroby a obecnością konkretnych antygenów HLA, jednakże ostatnie badania wskazują na ochronne działanie genu HLA-DRB1\*02 [37].

#### 11.4.5. Stwardnienie rozsiane

Stwardnienie rozsiane to przewlekłe, zapalne schorzenie centralnego układu nerwowego. Etiologia choroby nie jest jasna, ale uważa się, że podłożem mogą być reakcje autoimmunizacyjne. Nie wyklucza się zakażeń wirusowych (np. wirusa Epsteina-Barr) oraz czynników środowiskowych. Związek poszczególnych antygenów zgodności tkankowej z rozwojem stwardnienia rozsianego badany jest od ponad 30 lat. Obecnie, ryzyko rozwoju tej choroby koreluje się z ekspresją allelu HLA-DRB1\*15:01 [38]. Stwierdzono także, że obecność HLA-DR17 zwiększa ryzyko rozwoju stwardnienia rozsianego, choć jest ono znacznie niższe niż w przypadku DRB1\*15 [38]. Natomiast za chroniące przed rozwojem stwardnienia rozsianego uznaje się HLA-DRB1\*01 oraz DRB1\*10 [39].



#### 11.4.6. **Toczeń rumieniowaty układowy**

Toczeń jest przewlekłą chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, przebiegającą z zajęciem wielu tkanek i narządów. Najlepiej opisaną asocjacją specyficznych HLA z rozwojem tocznia, w wielu populacjach europejskich, jest obecność HLA klasy II: HLA-DR2 (DRB1\*15:01) i HLA-DR3 (DRB1\*03:01) [40]. Za związane z ryzykiem rozwoju tocznia uznano także trzy haplotypy: DRB1\*15:01(DR2)-DQB1\*06:02, DRB1\*08:01(DR8)-DQB1\*04:02 oraz DRB1\*03:01(DR3)-DQB1\*02:01 [41].

#### 11.4.7. **Autoimmunizacyjne choroby tarczycy**

Wczesne badania związku HLA z chorobą Gravesa-Basedowa ujawniły zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby w wyniku infekcji wirusowych u osób mających ekspresję HLA-B8 [42]. Jednakże, kolejne doniesienia wskazywały na podwyższony odsetek występowania HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (40-55%), w porównaniu do ogólnej populacji (30%) i to właśnie ten antygen wskazuje się jako główny czynnik ryzyka rozwoju schorzenia [42]. Spośród specyficzności DQ, asocjację z chorobą Gravesa-Basedowa wydają się wykazywać allel DQA1\*05:01, szczególnie w populacji kaukaskiej [43].

Korelacja HLA z chorobą Hashimoto wydaje się nie być tak definitywna jak w przypadku choroby Gravesa-Basedowa. Istnieją doniesienia o związku antygenów HLA-DR3 i DR4 oraz DQ7 (DQB1\*03:01) z ryzykiem rozwoju choroby Hashimoto w populacji kaukaskiej [44].

#### **Zespół Goodpasteur'a**

Jest to choroba autoimmunizacyjna objawiająca się układowym zapaleniem naczyń spowodowanym występowaniem przeciwciał przeciwko kolagenowi typu IV budującemu błonę podstawną w pęcherzykach płucnych i kłębuszkach nerkowych. Zespół Goodpasteur'a wykazuje silną asocjację z występowaniem określonych HLA klasy II. U około 80% pacjentów z tym zespołem wykrywa się allele grupy HLA-DRB1\*15. DRB1\*15:01 wykrywano w pacjentów z zespołem Goodpasteur'a niezależnie od badanej populacji [45]. U pacjentów tych opisano także zwiększoną częstość występowania HLA-DR2, który razem z HLA-B7 związany jest z cięższym klinicznie przebiegiem choroby [45].

### 11.5. **Choroby infekcyjne**

Różnice w podatności na zakażenia wywołane przez niektóre drobnoustroje tłumaczy się m.in. polimorfizmem genów układu HLA. Co ciekawe, konkretny zestaw genów HLA może pełnić rolę ochronną przeciwko jednemu patogenowi i równocześnie zwiększać podatność na inny [46].

### Zakażenie *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* to bakteria Gram-ujemna będąca pasożytem wewnątrzkomórkowym. Jest najczęstszym drobnoustrojem przenoszonym drogą płciową. Za najgroźniejsze powikłanie zakażenia *C. trachomatis* należy uznać niepłodność związaną z procesem zapalnym toczącym się w obrębie szyjki macicy. Nierozpoznane i nieleczone przypadki zakażenia tym drobnoustrojem stanowią poważny problem epidemiologiczny ze względu na możliwość łatwego przenoszenia na partnerów seksualnych oraz noworodki. Dotychczas nie udało się określić konkretnego zestawu genów mających związek ze zwiększeniem podatności na zakażenie *C. trachomatis*, ale u osób zakażonych wykazano zwiększoną częstość występowania allelu HLA-A\*68:02 [47].

### Malaria

Malaria jest jedną z najczęstszych chorób zakaźnych i najczęstszym zakażeniem pasożytniczym na świecie wywołanym przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*. Zależnie od regionu geograficznego jest to zakażenie *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, lub *P. vivax*. Zakażenie następuje po ukłuciu człowieka przez zakażonego komara. W organizmie człowieka pasożyt umiejscawia się w erytrocytach, gdzie namnaża się i doprowadza tym samym do ich rozpadu. Ekspresja alleli z grupy HLA-DRB1\*04 jest uznawana za czynnik zwiększający ryzyko zakażenia malarią. Opisano również antygeny mające charakter protekcyjny, chroniące przed zakażeniem. I tak np. w obrębie klasy I największą rolę protekcyjną przypisuje się HLA-B53, natomiast w obrębie klasy II wykryto haplotyp (obecny min. w populacji gambijskiej) DRB1\*13:02-DQB1\*05:01 korelujący ze zmniejszoną podatnością na zachorowanie na malarię i późniejszą anemią [48]. Różne badania potwierdziły także powiązanie określonych antygenów DR (głównie HLA-DR3) z lepszą odpowiedzią na zakażenie (zwiększony poziom produkcji przeciwciał) [49].

### Zakażenie *Mycobacterium leprae*

Trąd jest bakteryjną chorobą zakaźną wywołowaną przez *Mycobacterium leprae*. Zakażenie *M. leprae* może nastąpić przez kontakt z wydzielinami z owrzodzeń osoby chorej lub drogą kropelkową. Bakterie zasiedlają komórki Schwanna, czego efektem jest demielinizacja obwodowych włókien nerwowych. *M. leprae* może występować także w makrofagach, komórkach dendrytycznych i epitelialnych. Czynniki genetyczne odgrywają najistotniejszą rolę w regulacji podatności na rozwój infekcji, który następuje jedynie u 5% zakażonych osób. Tło genetyczne ma także wpływ na przebieg choroby. Za zwiększenie podatności na trąd odpowiada HLA-DRB1\*10, natomiast oporności – HLA-DRB1\*04 [50].

### Zakażenie wirusami zapalenia wątroby typu B i C

W przypadku zakażenia wirusami HBV i HCV antygenom układu zgodności tkankowej przypisywana jest znacząca rola w podatności na infekcję oraz odpo-

## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

wiedzi na leczenie. Zarówno rozwój formy aktywnej choroby jak i formy przewlekłej jest zależny od odpowiedzi immunologicznej organizmu regulowanej przez odpowiednie geny układu HLA. Zaznaczyć należy, że asocjacje z określonymi antygenami układu HLA wykazują bardzo duże zróżnicowanie ze względu na grupę etniczną, której dotyczą.

**HBV.** Podatność na zakażenie i rozwój formy przewlekłej choroby w populacji kaukaskiej jest związana z obecnością haplotypów: HLA- A\*01-B\*08-DRB1\*03, HLA-B44-C\*16:01 oraz HLA-B\*44-C\*05:01. W obrębie HLA klasy II największe znaczenie w rozwoju zarówno formy aktywnej jak i przewlekłej zakażenia przypisywane jest obecności alleli z grup HLA-DRB1\*13 oraz HLA-DRB1\*11, HLA-DRB1\*12. W populacji kaukaskiej funkcję ochronną przypisuje się natomiast obecności antygenów klasy I: A1, A10 i B7 oraz antygenów klasy II: HLA-DR4 oraz DR7 [51].

**HCV.** Badania pozwoliły określić kilka alleli oraz haplotypów powiązanych z podatnością na zakażenie wirusem typu C, opornością na infekcję, stopniem uszkodzenia wątroby oraz rozwojem nowotworów wątroby. Zdecydowanie większe znaczenie przypisuje się HLA klasy II. W populacji polskiej badania wykazały zwiększoną podatność na rozwój aktywnej i przewlekłej formy choroby u osób mających allele z grupy HLA-DRB1\*13. Działanie ochronne odgrywa natomiast obecność alleli HLA-DQB1\*03:01, HLA-DRB1\*15:01, HLA-DRA1\*01:03 (badania na populacji polskiej oraz niemieckiej) [51].

### Zakażenie wirusem Epsteina-Barr (EBV)

EBV należy do rodziny *Herpesviridae*, atakuje limfocyty B. Jest jednym z najpowszechniej występujących wirusów. Zakażenie zwykle przebiega bezobjawowo. Infekcja EBV może prowadzić do rozwoju mononukleozy. Istnieje także powiązanie pomiędzy infekcją EBV i kilkoma rodzajami nowotworów (np. chłoniak Burkitta, chłoniak Hodgkina). Coraz większą rolę związaną z ryzykiem infekcji EBV przypisuje się genom układu HLA. Allel HLA-A\*01:01 uznawany jest za allel zwiększający ryzyko choroby, natomiast HLA-A\*02:01 za zmniejszający ryzyko [52]. Ponadto u osób zakażonych EBV, u których rozwinął się chłoniak Hodgkina, stwierdzono częstszą obecność haplotypu HLA-A1, B37, DR10 [52].

## Literatura

- [1] Zembala M., Pituch-Noworolska A.: Immunopatogeneza i spektrum schorzeń autoimmunizacyjnych. W: Zarys immunologii klinicznej, red. M. Zembala, A. Górski, PZWL, Warszawa, 2001, 59-66
- [2] Acton R.T.: The major histocompatibility complex. W: Clinical Immunology. Principles and practice. 2nd edition. red.: R.R. Rich. Mosby International Ltd, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 2001, 6.1-6.13
- [3] Arnett F.C.: Seronegative spondyloarthropathies. (w:) Comprehensive Updated Text of Internal Medicine, Dale D.C, Federman D.G, (red.) 2002
- [4] Szczeklik A (red.) Choroby wewnętrzne. Przyczyny, rozpoznanie i leczenie, tom I. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, 2005.

- [5] Van Gaalen F.A., Does HLA-B\*2706 protect against ankylosing spondylitis? A meta-analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2012; 15(1): 8-12
- [6] Chavan H., Samant R., Deshpande A., Mankeshwar R.: Correlation of HLA B27subtypes with clinical features of ankylosing spondylitis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2011; 14(4): 369-374
- [7] Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A. i wsp.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 1988; 3: 315-324
- [8] Newton J.L., Harney S.M., Wordsworth B.P., Brown M.A.: A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2004; 5: 151-157
- [9] Milicic A., Lee D., Brown M.A., Darke C., Wordsworth B.P.: HLA-DR/DQ haplotype in rheumatoid arthritis: novel allelic associations in UK Caucasians. *J. Rheumatol.* 2002; 29: 1821-1826
- [10] Hannu T. Reactive arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2011; 25(3): 347-357
- [11] Oksanen A.M., Haimila K.E., Rautelin H.I.K., Partanen J.A.: Immunogenetic characteristics of patients with autoimmune gastritis. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(3): 354-358
- [12] Austin G.L., Herfarth H.H., Handler R.S.: A critical evaluation of serologic markers for inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 5: 545-547
- [13] Mokrowiecka A., Małeczka-Panas E.: Różnicowanie i leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Przeg. Lek.*, 2007; 1:56-65
- [14] Rodríguez-Bores L., Fonseca G.C., Villeda M.A., Yamamoto-Furusho J.K.: Novel genetic markers in inflammatory bowel disease *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(42): 5560-5570
- [15] Trachtenberg A., Yang H., Hayes E. i wsp. HLA Class II Haplotype Associations with Inflammatory Bowel Disease in Jewish (Ashkenazi) and Non-Jewish Caucasian Populations. *Human Immunology.* 2000; 61, 326-333
- [16] Stokkers P.C., Reitsma P.H., Tytgat G.N., van Deventer S.J.: HLADR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401
- [17] Ahmad T., Marshall S.E., Jewell D.: Genetics of inflammatory bowel disease: The role of the HLA complex. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(23): 3628-3635
- [18] Yamamoto-Furusho J.K.: Immunogenetics of chronic ulcerative colitis. *Rev. Invest. Clin.* 2003;55(6):705-710.
- [19] Zeng C.Q., Hu G.Z., Zeng Z.S., Lin L.J., Gu G.G.: Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J. Gastroenterol.* 2003; 9(8): 1646-1656
- [20] Rodrigo L., Alvarez N., Salas-Puig J., Hernández-Lahoz C.: Angelman syndrome and celiac disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2010; 102: 450-451
- [21] Dubois P.C., Trynka G., Franke L. i wsp.: Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.* 2010; 42, 295-302
- [22] Margaritte-Jeannin P., Babron M.C., Bourgey M. i wsp.: HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigen* 2004; 63: 562-567
- [23] Mayr W.R., Gschnait F., Brenner W.: HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: relationship to age of onset. *Wien Klin Wochenschr.* 1979; 91(5): 164-166
- [24] Schmitt-Egenolf M., Boehncke W.H., Ständer M., Eiermann T.H., Sterry W.: Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1\*0701/2,

## 11. Asocjacje HLA z wybranymi jednostkami chorobowymi

- DQA1\*0201, -DQB1\*0303 extended haplotype. *J Invest Dermatol.* 1993; 100(6): 749-752
- [25] Łuszczek W., Kubicka W., Cisło M. i wsp.: Strong association of HLA-Cw6 allele with juvenile psoriasis in Polish patients. *Immunol. Lett.* 2003; 85(1): 59-64
- [26] Szczerkowska-Dobosz A., Rebała K., Szczerkowska Z., Witkowska-Toboła A.: Correlation of HLA-Cw\*06 allele frequency with some clinical features of psoriasis vulgaris in the population of northern Poland. *J. Appl. Genet.* 2004; 45(4): 473-476
- [27] Ikäheimo I., Tiilikainen A., Karvonen J., Silvennoinen-Kassinen S.: HLA risk haplotype Cw6,DR7,DQA1\*0201 and HLA-Cw6 with reference to the clinical picture of psoriasis vulgaris. *Arch. Dermatol. Res.* 1996; 288(7): 363-365
- [28] Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology.* 1998; 50(2 Suppl 1): S16-22
- [29] Mignot E., Lin L., Rogers W. i wsp.: Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68(3): 686-699
- [30] Spagnolo P., du Bois R.M.: Genetics of sarcoidosis. *Clin. Dermatol.* 2007; 25(3): 242-249
- [31] Hedfors E., Lindström E.: HLA-B8/DR3 in sarcoidosis. Correlation to acute onset disease with arthritis. *Tissue Antigens.* 1983; 22(3): 200-203
- [32] Sato H., Grutters J.C., Pantelidis P. i wsp.: HLA-DQB1\*0201: a marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27(4): 406-412
- [33] Foley P.J., McGrath D.S., Puscinska E. i wsp.: Human leukocyte antigen-DRB1 position 11 residues are a common protective marker for sarcoidosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001; 25(3): 272-277
- [34] Noble J.A., Valdes A.M.: Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2011; 11(6): 533-542
- [35] Rønningen K.S., Markussen G., Iwe T., Thorsby E.: An increased risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) among HLA-DR4, DQw8/DRw8, DQw4 heterozygotes. *Hum. Immunol.* 1989; 24(3): 165-173
- [36] Valdes A.M., Thomson G., Graham J. et. al.: D6S265\*15 marks a DRB1\*15, DQB1\*0602 haplotype associated with attenuated protection from type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2005; 48(12): 2540-2543
- [37] Williams R.C., Muller Y.L., Hanson R.L. i wsp.: HLA-DRB1 reduces the risk of type 2 diabetes mellitus by increased insulin secretion. *Diabetologia.* 2011; 54(7): 1684-1692
- [38] Lincoln M.R., Montpetit A., Cader M.Z. i wsp.: A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 2005; 37(10): 1108-1112
- [39] Dymant D.A., Herrera B.M., Cader M.Z. i wsp.: Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14(14): 2019-2026
- [40] Deng Y., Tsao B.P.: Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010; 6(12): 683-692
- [41] Graham R.R., Ortmann W.A., Langefeld C.D. i wsp.: Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71: 543-553

- [42] Farid N.R., Stone E., Johnson G.: Graves' disease and HLA: clinical and epidemiologic associations. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1980; 13: 535-544
- [43] Marga M., Denisova A., Sochnev A., Pirags V., Farid N.R.: Two HLA DRB 1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves disease: relevance of cross-population studies. *Am. J. Med. Genet* 2001; 102(2): 188-191
- [44] Petrone A., Giorgi G., Mesturino C.A.: i wsp. Association of DRB1\*04-DQB1\*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001; 11(2): 171-175
- [45] Rees A.J., Peters D.K., Amos N., Welsh K.I., Batchelor J.R.: The influence of HLA-linked genes on the severity of anti-GBM antibody-mediated nephritis. *Kidney Int.* 1984; 26: 445-450
- [46] Conway D.J., Holland M.J., Campbell A.E. i wsp.: HLA Class I and II Polymorphisms and Trachomatous Scarring in a Chlamydia trachomatis-endemic Population *J Infect Dis.* 1996; 174(3): 643-646
- [47] Wilkinson R.J., Pasvol G.: Host resistance to malaria runs into swampy water. *Trends Microbiol.* 1997; 5: 213-215
- [48] Storti-Melo L.M., Reis da Costa D., Souza-Neiras W.C.: Influence of HLA-DRB-1 alleles on the production of antibody against CSP, MSP-1, AMA-1, and DBP in Brazilian individuals naturally infected with Plasmodium vivax. *Acta Tropica* 2012; 121: 152-155
- [49] Wertheim K., Kutkowska-Kaźmierczak A., Bal J.: Genetycznie uwarunkowana wrażliwość na wybrane choroby zakaźne u człowieka. *Medycyna Wieku Rozwojowego.* 2008; 3: 738-747
- [50] Vanderborght P.R., Pacheco A.G., Moraes M.E. i wsp.: HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 2007; 8: 320-324
- [51] Rashmi S., Rashmi K., Anil K., Khalid K.: A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(12); 1770-1787
- [52] Hislop A.D., Taylor G.S., Sauce D, Rickinson A.B.: Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 587-617

# CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA HLA KLASY I I II U PACJENTÓW Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ SZPIKOWĄ, BIAŁACZKAMI LIMFATYCZNYMI ORAZ U POTENCJALNYCH DAWCÓW SZPIKU

Barbara Krasnodębska-Szponder<sup>1</sup>, Katarzyna Galant<sup>1</sup>,  
Izabela Czyżewska<sup>1</sup>, Barbara Zdziarska<sup>2</sup>, Stefania Giedrys-Kalemba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii,  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie*

<sup>2</sup> *Klinika Hematologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie*

## Streszczenie

Celem pracy była analiza częstości występowania poszczególnych specyficzności HLA klasy I – *locus* A, B i C oraz HLA klasy II – *locus* DR u 144 pacjentów z białaczkami: ostrą białaczką szpikową (AML – 67 osób), ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL – 39 osób), przewlekłą białaczką szpikową (CML – 38 osób) oraz porównanie częstości ich występowania z grupą kontrolną 200 osób zdrowych. Badaniem zostali objęci pacjenci Kliniki Hematologii PUM oraz zdrowi, niespokrewnieni, potencjalni dawcy szpiku kostnego. Antygeny HLA oznaczano metodą biologii molekularnej PCR-SSP. Stwierdzono istotnie częstsze występowanie HLA-DRB1\*11 w grupie pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną ( $p=0,0002$ ) oraz HLA-DRB1\*01 ( $p=0,0001$ ) i HLA-DRB1\*16 ( $p=0,001$ ) w grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Wśród HLA klasy I wykazano istotne statystycznie różnice w przypadku: A\*03 ( $p=0,02$ ), B\*18 ( $p=0,01$ ), B\*35 ( $p=0,01$ ), B\*44 ( $p=0,003$ ), C\*02 ( $p=0,009$ ) u pacjentów z AML; A\*03 ( $p=0,02$ ), B\*35 ( $p=0,04$ ) u pacjentów z ALL; B\*13 ( $p=0,04$ ) u pacjentów z CML. Uzyskane wyniki wskazują na silną dodatnią asocjację antygenów HLA DRB1\*01 oraz DRB1\*16, mniejszą z C\*02, zaś ujemną korelację z A\*03, B\*18, B\*35 i B\*44 w ostrej białaczce szpikowej. W ostrej białaczce limfoblastycznej silną dodatnią asocjację znaleziono dla DRB1\*11, mniejszą dla A\*03 i B\*35, natomiast u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową jedynie z B\*13.

**Słowa kluczowe:** HLA klasa I, HLA klasa II, ostra białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, przewlekła białaczka szpikowa

## 12.1. Wstęp

Główny układ zgodności tkankowej MHC (ang. *major histocompatibility complex*) określanymi u ludzi mianem układu HLA (ang. *human leukocyte antigens*) odgrywa ważną rolę zarówno w transplantologii jak i w innych dziedzinach biologii i medycyny. Wśród antygenów HLA mających znaczenie w transplantologii znajdują się antygeny HLA klasy I – *locus* A, B i C oraz HLA klasy II – *locus* DR i DQ. Duży polimorfizm alleli HLA w populacji odgrywa znaczącą rolę w zwalczaniu różnorodnych patogenów, które stale ulegają, w zależności od czynników środowiskowych czy stosowanych leków, licznym zmianom antygenowym. Wykazano również istotny związek pomiędzy HLA klasy I - głównie *locus* B oraz HLA klasy II – głównie *locus* DR z wieloma chorobami, w tym z chorobami nowotworowymi krwi.

Pierwszą białaczką, w której znaleziono korelację z układem HLA, była dziecięca ostra białaczka limfoblastyczna [1]. Dalsze badania dotyczące związku HLA z białaczkami wykazały, że istnieje nietypowa segregacja antygenów HLA u rodzin z białaczkami, przejawiająca się wzrostem homozygotyczności [2] oraz identycznych antygenów HLA u rodzeństwa [3]. Antygeny HLA mogą przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju białaczki nie tylko poprzez rozpoznanie i prezentację obcych antygenów wirusowych limfocytom T-cytotoksycznym i komórkom NK, ale również poprzez ucieczkę przed mechanizmami obronnymi gospodarza, np. obniżona ekspresja HLA klasy I związana jest z rakiem piersi i rakiem jajnika [4].

Już pod koniec ubiegłego stulecia i na początku tego wieku pojawiły się liczne prace obejmujące pacjentów różnych ras i osoby zdrowe zamieszkujące różne regiony geograficzne, wskazujące powiązanie antygenów HLA z chorobami nowotworowymi krwi [5–8]. Brak jest natomiast analogicznych publikacji dotyczących populacji polskiej.

Celem pracy była analiza rozkładu specyficzności HLA klasy I oraz HLA klasy II – *locus* DR u pacjentów z: ostrą białaczką szpikową (ang. *acute myeloid leukemia*, AML), ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL) i przewlekłą białaczką szpikową (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML) oraz porównanie częstości ich występowania z grupą osób zdrowych.

## 12.2. Metodyka

**Pacjenci** Badaniem objęto 144 pacjentów leczonych w Klinice Hematologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie w latach 2008-2011. W grupie badanej znalazło się 67 osób z ostrą białaczką szpikową (38 kobiet i 29 mężczyzn, średnia wieku 42,4 lata), 39 osób z ostrą białaczką limfoblastyczną (16 kobiet i 23 mężczyzn, średnia wieku 38,4 lata) oraz 38 osób z przewlekłą białaczką szpikową (18 kobiet i 20 mężczyzn, średnia wieku 40,3 lata). Grupę kontrolną stanowiło 200 zdrowych, niespokrewnionych osób – potencjalnych dawców szpiku kostnego.



**Metoda** Ludzkie genomowe DNA izolowano z krwi obwodowej klasyczną metodą „*salting out*” przy użyciu zestawu Blood Mini Kit (A&A Biotechnology, Polska). Metoda ta oparta jest na lizie krwinek czerwonych przy użyciu detergentu i proteiny K degradującej białka oraz zastosowaniu kolumn ze złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez złożę osiada na nim, a następnie wymywane jest niskojonowym buforem.

Pomiar stężenia oraz czystości DNA oznaczano za pomocą aparatu Gene Quant (Pharmacia Biotech) przy długości fali 260 nm. Typowanie antygenów układu HLA wykonano z zastosowaniem metody PCR-SSP na poziomie niskiej rozdzielczości, przy użyciu zestawów „Ready Gene A\*, B\*, C\*, DRB1\* Low Resolution SSP Typing Kit” firmy Inno-Train Diagnostics, Germany. Metoda PCR-SSP (ang. *polymerase chain reaction - sequence specific priming*), pozwala na namnożenie (amplifikację) określonej sekwencji DNA. W każdej próbce PCR, gdzie startery znajdują specyficzną sekwencję, charakterystyczną dla danego allelu/grupy alleli HLA, dobudowywany jest komplementarny fragment [9]. W próbkach, gdzie nie ma specyficznych sekwencji HLA, startery nie przyłączają się. W każdej próbce są również startery do amplifikacji kontroli wewnętrznej.

Produkty amplifikacji identyfikowano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem 0,7  $\mu\text{g/ml}$  bromku etydyny. Do analizy statystycznej zastosowano test  $\chi^2$ , a w przypadku stwierdzenia wartości oczekiwanej mniejszej od 10 lub 5 zastosowano odpowiednio test  $\chi^2$  z poprawką Yatesa lub dokładny test Fishera, używając programu Statistica wersja 10.

### 12.3. Wyniki

Wśród HLA klasy I, zarówno w grupach badanych jak i grupie kontrolnej zidentyfikowano 15 specyficzności w *locus* A, 24 w *locus* B oraz 13 w *locus* C. Niektóre z nich występowały istotnie częściej w badanych grupach pacjentów niż u osób zdrowych. W grupie pacjentów z AML było to HLA C\*02 (20,9% vs 9%,  $p=0,009$ ), u pacjentów z ALL A\*03 (48,7% vs 30%,  $p=0,02$ ) i B\*35 (41% vs 25%,  $p=0,04$ ), natomiast u pacjentów z CML B\*13 (18,4% vs 8%,  $p=0,04$ ).

Wśród badanych HLA klasy I stwierdzono również specyficzności, które występowały istotnie rzadziej niż w grupie kontrolnej, ale jedynie u pacjentów z AML. Są to: A\*03 (14,9% vs 30%,  $p=0,02$ ), B\*18 (6% vs 18,5%,  $p=0,01$ ), B\*35 (10,4% vs 25%,  $p=0,01$ ) oraz B\*44 (10,4% vs 28%,  $p=0,003$ ). Szczegółowe wyniki rozkładu antygenów HLA klasy I przedstawiono w Tabelach 12.1, 12.2, 12.3.

Wśród HLA klasy II *locus* DR stwierdzono obecność 13 specyficzności i zaobserwowano następujące różnice. HLA-DRB1\*11 występowało częściej we wszystkich grupach pacjentów, przy czym różnica w grupie pacjentów z ALL była istotna statystycznie (48,7%, grupa kontrolna 20,5%,  $p=0,0001$ ). Z kolei HLA-DRB1\*01 oraz HLA-DRB1\*16 występowały częściej u pacjentów z AML (odpowiednio  $p=0,0001$  oraz  $p=0,001$ ). HLA-DRB1\*01 oraz DRB1\*04 występowały rzadziej u pacjentów z CML (odpowiednio 2,6% oraz 13,1%) niż w grupie kontrolnej (12,5% oraz 22%), jednak nie były to różnice istotne statystycznie. Szczegółowe wyniki rozkładu antygenów HLA klasy II przedstawiono w Tabeli 12.4.

Tabela 12.1: Rozkład częstości występowania specyficzności HLA *locus* A\* w badanych grupach pacjentów i w grupie kontrolnej.

HLA-A	Ostra białaczka szpikowa (AML) N=67	Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) N=39	Przewlekła białaczka szpikowa (CML) N=38	Grupa kontrolna N=200
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
A*01	16 (23,9)	4 (10,2)	11 (28,9)	38 (19,0)
A*02	39 (58,2)	19 (48,7)	16 (42,1)	101 (50,5)
A*03	10 (14,9)*	19 (48,7)*	12 (31,6)	60 (30,0)*
A*11	9 (13,4)	4 (10,2)	4 (10,5)	30 (15,0)
A*23	3 (4,5)	-	2 (5,3)	12 (6,0)
A*24	12 (17,9)	9 (23,1)	10 (26,3)	39 (19,5)
A*25	5 (7,5)	1 (2,6)	4 (10,5)	21 (10,5)
A*26	7 (10,4)	4 (10,2)	4 (10,5)	16 (8,0)
A*29	3 (4,5)	-	-	6 (3,0)
A*30	3 (4,5)	2 (5,1)	1 (2,6)	6 (3,0)
A*31	3 (4,5)	-	-	12 (6,0)
A*32	4 (6,0)	2 (5,1)	3 (7,9)	10 (5,0)
A*33	2 (3,1)	2 (5,1)	-	7 (3,5)
A*66	2 (3,1)	1 (2,6)	1 (2,6)	4 (2,0)
A*68	3 (4,5)	3 (7,7)	2 (5,3)	13 (6,5)

\* - różnice istotne statystycznie

W badanych grupach stwierdzono obecność następującej liczby haplotypów: 165 (AML), 106 (ALL), 98 (CML) oraz 426 (grupa kontrolna). W grupach pacjentów z białaczkami niektóre haplotypy występowały częściej lub nie występowały w grupie kontrolnej. U pacjentów z CML: haplotyp A\*03 B\*35 DRB1\*11 oraz A\*03 B\*35 DRB1\*13 występowały odpowiednio z częstością 10,5% oraz 7,9%, zaś w grupie kontrolnej z częstością 1%. U pacjentów z AML zaobserwowano częstsze występowanie haplotypu A\*03 B\*44 DRB1\*15 (11,9%, grupa kontrolna 1,5%). Natomiast najczęstszy haplotyp obserwowany w grupie kontrolnej: A\*01 B\*08 DRB1\*03 (16%), występował 3-krotnie rzadziej u osób z ALL (5,1%). Haplotypy „białaczkowe”, które nie występowały w grupie kontrolnej osób zdrowych to: A\*24 B\*35 DRB1\*07 oraz A\*24 B\*35 DRB1\*11. Różnice w występowaniu poszczególnych haplotypów pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie (Tabela 12.5).

## 12.4. Podsumowanie

Występowanie i asocjacje antygenów układu HLA z białaczkami zostały zaobserwowane i udokumentowane przez różnych autorów w doniesieniach zarówno europejskich jak i światowych. Autorzy chińscy wykazali częstsze wystę-

12. Częstość występowania HLA klasy I i II ...

Tabela 12.2: Rozkład częstości występowania specyficzności HLA *locus* B\* w badanych grupach pacjentów i w grupie kontrolnej.

HLA-B	Ostra białaczka szpikowa (AML) N=67	Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) N=39	Przewlekła białaczka szpikowa (CML) N=38	Grupa kontrolna N=200
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
B*07	16 (23,9)	10 (25,6)	8 (21,0)	53 (26,5)
B*08	11 (16,4)	5 (12,8)	6 (15,8)	36 (18,0)
B*13	6 (9,0)	4 (10,2)	7 (18,4)*	16 (8,0)*
B*14	7 (10,4)	1 (2,6)	-	5 (2,5)
B*15	7 (10,4)	2 (5,1)	6 (15,8)	21 (10,5)
B*18	4 (6,0)*	3 (7,7)	5 (13,1)	37 (18,5)*
B*27	10 (14,9)	4 (10,2)	4 (10,5)	24 (12,0)
B*35	7 (10,4)*	16 (41,0)*	8 (21,0)	50 (25,0)*
B*37	1 (1,5)	2 (5,1)	-	3 (1,5)
B*38	7 (10,4)	3 (7,7)	4 (10,5)	14 (7,0)
B*39	3 (4,5)	1 (2,6)	1 (2,6)	9 (4,5)
B*40	8 (11,9)	1 (2,6)	4 (10,5)	21 (10,5)
B*41	3 (4,5)	1 (2,6)	3 (7,9)	16 (8,0)
B*44	7 (10,4)*	9 (23,1)	8 (21)	56 (28,0)*
B*45	1 (1,5)	-	-	3 (1,5)
B*47	1 (1,5)	-	-	2 (1,0)
B*49	3 (4,5)	2 (5,1)	1 (2,6)	6 (3,0)
B*50	2 (3,0)	3 (7,7)	3 (7,9)	6 (3,0)
B*51	2 (3,0)	4 (10,2)	2 (5,3)	20 (10,0)
B*52	4 (6,0)	-	-	12 (6,0)
B*55	1 (1,5)	-	-	2 (1,0)
B*56	2 (3,0)	-	1 (2,6)	5 (2,5)
B*57	4 (6,0)	3 (7,7)	3 (7,9)	15 (7,5)
B*58	1 (1,5)	-	1 (2,6)	3 (1,5)

\* - różnice istotne statystycznie

powanie A\*02, A\*11, B\*58 oraz DRB1\*09 u pacjentów z CML oraz B\*13 u pacjentów z ALL [10]. W badaniach własnych wyniki te nie znalazły potwierdzenia. W analizowanych przez nas grupach pacjentów z AML, ALL i CML nie wykazano różnic istotnych statystycznie w występowaniu zarówno antygenów A\*02, A\*11, B\*58 jak i antygeny DRB1\*09 w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei Ucar i wsp. [11] zaobserwowali wzrost częstości HLA-A\*11 i DRB1\*01 u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną pochodzących z Turcji. Również w badaniach własnych zaobserwowano wzrost częstości występowania DRB1\*01 u pacjentów

Tabela 12.3: Rozkład częstości występowania specyficzności HLA *locus C\** w badanych grupach pacjentów i w grupie kontrolnej.

HLA-C	Ostra białaczka szpikowa (AML) N=67	Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) N=39	Przewlekła białaczka szpikowa (CML) N=38	Grupa kontrolna N=200
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
C*01	2 (3,0)	1 (2,6)	3 (7,9)	20 (10,0)
C*02	14 (20,9)**	7 (17,9)	5 (13,1)	18 (9,0)**
C*03	14 (20,9)	3 (7,7)	7 (18,4)	24 (12,0)
C*04	12 (17,9)	15 (38,5)	11 (28,9)	61 (30,5)
C*05	4 (6,0)	2 (5,1)	2 (5,3)	16 (8,0)
C*06	14 (20,9)	10 (25,6)	13 (34,2)	36 (18,0)
C*07	37 (55,2)	19 (48,7)	19 (50)	110 (55,0)
C*08	5 (7,5)	1 (2,6)	-	5 (2,5)
C*12	17 (25,4)	6 (15,4)	7 (18,4)	44 (22,0)
C*14	1 (1,5)	1 (2,6)	1 (2,6)	5 (2,5)
C*15	1 (1,5)	1 (2,6)	1 (2,6)	3 (1,5)
C*16	3 (4,5)	2 (5,1)	1 (2,6)	6 (3,0)
C*17	1 (1,5)	1 (2,6)	2 (5,3)	5 (2,5)

\*\* - różnice istotne statystycznie

z ALL w porównaniu z grupą kontrolną (20,5% vs 12,5%), jednak nie była to różnica istotna statystycznie. Natomiast istotny statystycznie wzrost częstości występowania DRB1\*01 stwierdzono w grupie pacjentów z AML (34,3% vs 12,5%,  $p=0,0001$ ). Badacze ci podają również, iż najczęściej obserwowanym haplotypem u pacjentów z AML jest A\*03 B\*51 DRB1\*11, natomiast u pacjentów z ALL - A\*02 B\*35 DRB1\*01. W badaniach własnych bardzo podobny haplotyp: A\*03 B\*35 DRB1\*11 występował z kolei najczęściej wśród pacjentów z CML.

Odwrotną sytuację zaobserwowali Kabbaj i wsp. [12], którzy stwierdzili, że antygen HLA-DRB1\*01 występuje znacznie rzadziej u pacjentów z białaczkami w Maroku.

Inne asocjacje wynikające z badań własnych dotyczą istotnie statystycznie częstszego występowania antygeny HLA-B\*13 u pacjentów z CML (18,4% - 8%). Podobne wyniki uzyskali Naugler i Liwski [13], którzy przebadali grupę osób zamieszkujących wschodnie rejony Kanady: 31 pacjentów z CML, 258 osób z grupy kontrolnej. Oprócz HLA-B\*13 stwierdzili oni również istotnie częstsze występowanie HLA-B\*55. Z kolei w naszej grupie badanych pacjentów z CML nie stwierdzono obecności HLA-B\*55.

U pacjentów z AML niektóre antygeny HLA klasy I wystąpiły istotnie statystycznie rzadziej niż w grupie kontrolnej: A\*03, B\*18, B\*35 i B\*44. W badaniach Ozdili i wsp. [14], dotyczących tureckiej populacji dzieci z AML również stwier-

## 12. Częstość występowania HLA klasy I i II ...

Tabela 12.4: Rozkład częstości występowania specyficzności HLA *locus* DRB1\* w badanych grupach pacjentów i w grupie kontrolnej.

HLA-DR	Ostra białaczka szpikowa (AML) N=67	Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) N=39	Przewlekła białaczka szpikowa (CML) N=38	Grupa kontrolna N=200
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
DRB1*01	23 (34,3)**	8 (20,5)	1 (2,6)	25 (12,5)**
DRB1*03	13 (19,4)	7 (17,9)	9 (23,7)	48 (24,0)
DRB1*04	16 (23,9)	9 (23,1)	5 (13,1)	44 (22,0)
DRB1*07	14 (20,9)	7 (17,9)	12 (31,6)	53 (26,5)
DRB1*08	3 (4,5)	2 (5,1)	3 (7,9)	14 (7,0)
DRB1*09	-	-	1 (2,6)	3 (1,5)
DRB1*10	1 (1,5)	-	-	2 (1)
DRB1*11	21 (31,3)	19 (48,7)**	14 (36,8)	41 (20,5)**
DRB1*12	1 (1,5)	1 (2,6)	5 (13,1)	9 (4,5)
DRB1*13	17 (25,4)	8 (20,5)	11 (28,9)	52 (26,0)
DRB1*14	1 (1,5)	3 (7,7)	1 (2,6)	5 (2,5)
DRB1*15	17 (25,4)	9 (23,1)	8 (21)	52 (26,0)
DRB1*16	16 (23,9)**	3 (7,7)	-	9 (4,5)**

\*\* - różnice wysoce istotne statystycznie

Tabela 12.5: Najczęstsze wybrane haplotypy występujące u badanych pacjentów i osób zdrowych.

Haplotyp	Ostra białaczka szpikowa (AML) N=67	Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) N=39	Przewlekła białaczka szpikowa (CML) N=38	Grupa kontrolna N=200
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
A*01 B*08 DRB1*03	8 (11,9)	2 (5,1)	4 (10,5)	32 (16,0)
A*02 B*07 DRB1*15	7 (10,4)	4 (10,2)	2 (5,3)	20 (10,0)
A*02 B*35 DRB1*07	3 (4,5)	4 (10,2)	2 (5,3)	8 (4,0)
A*02 B*44 DRB1*07	-	3 (7,7)	3 (7,9)	8 (4,0)
A*03 B*13 DRB1*11	-	2 (5,1)	-	9 (4,5)
A*03 B*35 DRB1*13	-	-	3 (7,9)	2 (1,0)
A*03 B*35 DRB1*11	-	-	4 (10,5)	2 (1,0)
A*03 B*44 DRB1*15	8 (11,9)	1 (2,6)	-	3 (1,5)
A*24 B*35 DRB1*07	3 (4,5)	2 (5,1)	-	-

dzono radsze występowanie antygenów HLA klasy I, jednak były one odmienne niż w badaniach własnych i dotyczyły: A\*11 oraz B\*38.

Ciekawe analizy przeprowadzili również badacze irańscy. Sarafnejad i wsp. [15] porównując grupę 60 pacjentów z AML i 180 osób z grupy kontrolnej wykazali dodatnią korelację antygeny HLA-DRB1\*11 z AML. Nasze badania również potwierdzają ten związek. Występowanie HLA-DRB1\*11 w grupie pacjentów z AML także było wyższe niż w grupie kontrolnej (31,9% vs 20,5%), ale nieznamienne statystycznie; wysoce istotne statystycznie różnice wykazano natomiast u pacjentów z ALL (48,7% vs 20,5%,  $p=0,0002$ ).

W badaniach własnych stwierdzono także częstsze występowanie HLA-DRB1\*01 ( $p = 0,0001$ ) i HLA-DRB1\*16 ( $p=0,001$ ) u pacjentów z AML. Ponadto we wszystkich badanych grupach obserwowano występowanie DRB1\*03, DRB1\*07, DRB1\*08, DRB1\*13, DRB1\*15 na mniej więcej tym samym poziomie co w grupie kontrolnej. Odmienne wyniki otrzymali Fernandes i wsp. [16] badając populację brazylijską. Badacze ci wykazali istotny związek HLA-DRB1\*07 z AML oraz HLA-DRB1\*03 z ALL. Wyniki badań własnych wykonane u osób rasy kaukaskiej zamieszkujących region Pomorza Zachodniego wykazały asocjacje niektórych antygenów HLA klasy I i II z odpowiednim typem białaczki. Najwięcej asocjacji stwierdzono w najliczniejszej z grup badanych, tj. u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML). W grupie tej silną dodatnią asocjację wykazano z DRB1\*01 oraz DRB1\*16, mniejszą z C\*02, zaś ujemną korelację z A\*03, B\*18, B\*35 i B\*44. W ostrej białaczkce limfoblastycznej silną dodatnią asocjację znaleziono dla DRB1\*11, mniejszą dla A\*03 i B\*35, natomiast u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową jedynie z B\*13.

## Literatura

- [1] Walford R.L., Finkelstein S., Neerhout R., Konrad P., Shambrom E.: Acute childhood leukaemia in relation to the HLA human transplantation genes. *Nature* 1970; 225: 461-462
- [2] Mueller L.P., Machulla H.K.: Increased of homozygosity for HLA class II loci in female patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2002; 43(5): 1013-1019
- [3] Hosking F.J., Leslie S., Moutsianas L. i wsp.: MHC variation and risk of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117: 1633-1640
- [4] Vitale M., Rezzani R., Rodella L. i wsp.: HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 67-72
- [5] Barion L.A., Tsuneto L.T., Teta G.V. i wsp.: Association between HLA and leukemia in a mixed Brazilian population. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2007; 53(3): 252-256
- [6] Chiewsilp P., Sujirachato K., Mongkolsuk T., Junpong S., Jootar S., Hathirat P.: Preliminary study of HLA-ABCD antigens in CML, ANLL, thalassemia and severe aplastic anemia in Thais. *J. Med. Assoc. Thai.*, 2000; 83(1): 130-136
- [7] Villalobos C., Rivera S., Weir-Medina J., Hassanhi M., Montiel M., Gonzalez R.: Association of HLA class I and leukemia in mestizo patients of the state of Zulia, Venezuela. *Invest. Clin.*, 2003; 44(4): 283-289
- [8] Zhang M.Y., Chen F.Y., Zhong H.: Meta-analysis of human leukocyte antigen genetic polymorphisms and susceptibility to chronic myelogenous leukemia in Chinese

## 12. Częstość występowania HLA klasy I i II ...

- population. *Leuk. Res.*, 2011; 35(12): 1564-1570
- [9] Bunce M., O'Neill C.M., Barnado M.C. i wsp.: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, and DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367
- [10] Liao Y.Q., Zhu M.H., Wang M., Jiang G.M., Wang B.L.: Associations of human leukocyte antigen – A, B, DRB1 genes with leukemia patients in Anhui province of China. *Zhongguo Shi. Yan Xue. Ye Xue Za* 2010; 18(4): 1055-1058
- [11] Ucar F., Sonmez M., Erkut N. i wsp.: Relation of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes in patients with acute leukemia: a case control study. *Arch. Med. Res.*, 2011; 42(4): 306-310
- [12] Kabbaj M., Oudghiri M., Naya A.: HLA-A, -B, -DRB1 alleles and haplotypes frequencies in Moroccan patients with leukemia. *Ann. Biol. Clin.*, 2010; 68(3): 291-296
- [13] Naugler C., Liwski R.: HLA risk markers for chronic myelogenous leukemia in Eastern Canada. *Leuk. Lymphoma* 2009; 50(2): 254-259
- [14] Ozdili K., Oguz E.S., Anak S., Kekik C., Carin M., Gedikoglu G.: The frequency of HLA class I and II alleles in Turkish childhood acute leukaemia patients. *J. Int. Med. Res.*, 2010; 38(5):1835-1844
- [15] Sarafnejad A., Khosravi F., Alimoghadam K. i wsp.: HLA class II allele and haplotype frequencies in iranian patients with acute myelogenous leukemia and control group. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2006; 5(3): 115-119
- [16] Fernandes T.A., Fukai R., Souza C.A., Lorand-Metze I., Magna L.A., Kraemer M.H.: Molecular identification of the HLA-DRB1-DQB1 for diagnosis and follow-up of acute leukemias. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2010; 44(2): 69-73

# BADANIA TECHNIKAMI CYTOGENETYKI KLASYCZNEJ (KARIOTYPOWANIE) I FLUORESCENCYJNEJ HYBRYDYZACJI *in situ* (FISH) W HEMATOONKOLOGII

Barbara Pieńkowska-Grela

*Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii -  
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa*

## Streszczenie

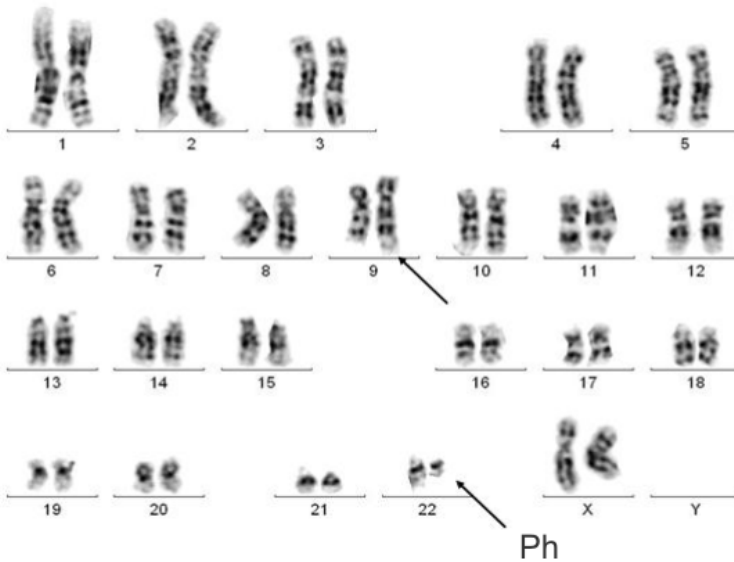
Zaburzenia struktury genetycznej w istotny sposób destabilizują funkcjonowanie komórki. Poznanie znaczenia takich nieprawidłowości jest efektem wielu dziesięcioleci pracy genetyków, którzy opisywali zarówno morfologiczne objawy, jak i funkcjonalne skutki aberracji cytogenetycznych. Postęp wiedzy i technologii umożliwia dziś detekcję ogromnej ilości różnego typu zdefiniowanych zaburzeń genetycznych, tak dziedzicznych, jak i powstałych *de novo* w procesie transformacji nowotworowej. W laboratoriach cytogenetyki onkologicznej wykonywane są badania, pozwalające wykryć i ocenić aberracje, specyficzne dla komórek tkanki nowotworowej pobranej od pacjenta. Cytogenetyk może ocenić zmiany liczby i struktury chromosomów metafazowych jak też status określonych genów czy wybranych regionów zdespiralizowanej nici DNA w jądrze interfazowym. Standardowe metody cytogenetyczne to kariotypowanie i FISH, jednak nierutynowe dziś techniki cytogenetyki molekularnej stają się coraz ważniejsze w procesie diagnostycznym. Interpretacja danych cytogenetycznych, dokonywana na podstawie współczesnej wiedzy i w oparciu o obowiązujące zasady diagnostyczne, wskazuje możliwe skutki kliniczne aberracji cytogenetycznych i ma kluczowe znaczenie w diagnostyce wielu typów nowotworów. Ciągły postęp badań naukowych i medycznych sukcesywnie dostarcza nowych wskazań i powoduje konieczność ciągłego uaktualniania wiedzy, jednak podstawowe algorytmy badawcze wytrzymały próbę czasu i nadal dostarczają praktycznych informacji. Wyniki badania cytogenetycznego, szczególnie w hematoonkologii, w znacznej mierze wpływają dziś na decyzje kliniczne.

*Słowa kluczowe:* badania cytogenetyczne, hematoonkologia, aberracja, kariotypowanie, FISH



### 13.1. Wstęp

Molekularnym podłożem procesu nowotworowego są zmiany w strukturze i funkcjonowaniu aparatu genetycznego komórki. Morfologicznym wyrazem takich zmian są aberracje kariotypowe, widoczne w obrazie chromosomów metafazowych (Rycina 13.1). Znaczna część znanych, klonalnych aberracji chromosomowych jest specyficznie związana z określonym typem nowotworu. Niektóre z nich, zmiany pierwotne, uznawane są za krytyczne, determinujące powstanie nowotworu na poziomie genetycznym. Inne, zwane zmianami wtórnymi, związane są zwykle progresją i mają znaczenie predykcyjne.



Rycina 13.1: Kariotyp komórki szpiku pacjentki z przewlekłą białaczką szpikową. Strzałki wskazują nieprawidłowe kopie chromosomów 9 i 22 (chromosom Filadelfia, Ph), powstałe w wyniku translokacji  $t(9;22)(q34;q11)$

W metafazach komórek nowotworu widoczne są odstępstwa od obrazu prawidłowego, cytogenetycznie wyrażające się, jako nieprawidłowości kariotypu. Efektem zaburzeń widocznych jako zmiany struktury chromosomów są modyfikacje aktywności genów zlokalizowanych w obszarze pęknięć, utrat bądź powieleń. Najczęściej zmiany funkcjonowania komórki w procesie transformacji nowotworowej zachodzą w wyniku aktywacji onkogenów, inaktywacji genów supresorowych czy fuzji genowych. Wzór aberracji cytogenetycznych jest odmienny w różnych typach nowotworów. Wykazuje on szerokie spektrum: od pojedynczych zmian strukturalnych bądź liczbowych do głębokich, licznych uszkodzeń kariotypu (ang. *complex karyotype*). Badanie cytogenetyczne wykrywa takie zmiany i łączy charakterystyczne aberracje z procesami powstawania i rozwoju nowotworu.

W wiodących ośrodkach hematoonkologicznych na świecie badanie cytogenetyczne jest niezbędnym etapem procesu diagnostycznego. Aktualnie obowiązująca klasyfikacja nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego, opublikowana we wrześniu 2008 przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), oparta jest przede wszystkim na znajomości zaburzeń genetycznych, wyróżniających typy białaczek i chłoniaków, o określonych cechach morfologicznych, cytochemicznych, immunofenotypowych i klinicznych [1]. Poznanie podłoża genetycznego i molekularnego nowotworów stało się w ostatnich latach podstawą reklasyfikacji wielu białaczek i chłoniaków w stosunku do wcześniejszej obowiązujących ustaleń. Dostęp do badań cytogenetycznych, wiedza o ich znaczeniu, a także dobra współpraca między klinicystą i cytogenetykiem jest nie do przecenienia we współczesnej diagnostyce białaczek i chłoniaków.

## 13.2. Klasyczna technika cytogenetyczna – kariotypowanie

Klasycznie, przedmiotem badania cytogenetyki są chromosomy. Chromosomy odkryto i nazwano jeszcze w XIX wieku, ale dopiero w drugiej połowie XX stulecia określono ich liczbę i strukturę w prawidłowych komórkach człowieka. Pod koniec roku 1955 Joe Hin Tjio, Chińczyk pracujący w Europie oraz Szwed - Albert Levan ustalili, że człowiek posiada w komórce somatycznej 46 chromosomów [2]. W chromosomach w trakcie podziału komórkowego upakowane jest DNA, które poza tą fazą życia komórki znajduje się w formie luźnej chromatyny jądrowej. Wzorzec prawidłowych chromosomów stanowi do dzisiaj morfologiczny punkt odniesienia w badaniach cytogenetycznych, a rodzaj odstępstw od wzoru prawidłowego jest podstawą międzynarodowego systemu nomenklatury cytogenetycznej (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN 2009) [3].

Materiałem do analizy cytogenetycznej w hematoonkologii są: szpik, krew, materiał z biopsji węzła chłonnego bądź fragmenty innych, zmienionych nowotworowo tkanek. Warunkiem powodzenia badania jest przeprowadzenie hodowli *in vitro*, w celu uzyskania intensywnego wzrostu komórek nowotworu. Wtedy to badacz ma szansę ocenić morfologię chromosomów metafazowych, a zatem określić odstępstwa od ich prawidłowej liczby i struktury. Preparaty cytogenetyczne, zawierające metafazy, barwione są różnicowo dla uzyskania prążków G (ang. *G-banding*), pozwalających na identyfikację poszczególnych chromosomów [4]. Tak przygotowany materiał jest analizowany w mikroskopie świetlnym, zwykle przy użyciu komputerowego systemu analizy obrazu, ułatwiającego techniczne przygotowanie do oceny zmian. Kariotypowanie nie jest procesem odbywającym się automatycznie: funkcjonujące na rynku systemy wyposażone w „moduł do kariotypowania” pozwalają jedynie na przybliżoną ocenę kariogramu. W szczegółowej analizie ostateczną decyzję podejmuje diagnosta, którego wiedza i doświadczenie są kluczowymi czynnikami prawidłowej interpretacji uzyskanego wzoru prążkowego chromosomów. W pojedynczym badaniu ocenianych jest zwykle 20 metafaz, a aberracje, które wyrażają odstępstwo od obrazu

prawidłowego, muszą wykazywać charakter nielosowy. Przy pracy z materiałem nowotworowym ważnym elementem wyniku jest też ocena ewolucji klonalnej (progresji zmian). Standardowy wynik opisujący całość widocznych zmian, tworzony jest zgodnie z ustalonymi zasadami [5, 6].

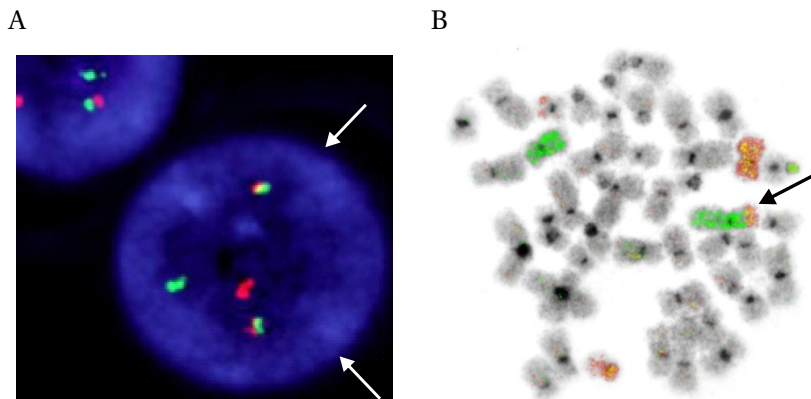
Dzięki analizie prążkowej można jednoznacznie określić w komórkach nowotworu obecność lub brak diagnostycznie ważnych translokacji, takich jak: t(9;22)(q34;q11), t(8;21)(q22;q22) czy t(8;14)(q24;q32). Analiza kariotypowa pozwala także na wykrycie utrat całych kopii chromosomów (monosomie) bądź ich fragmentów (delecje) np. obecność -7/del(7q) będące czynnikiem pogarszającym rokowanie w rozrostach szpikowych. Widoczne jest również powielenie liczby kopii całych chromosomów (np. +8 w MDS/AML) lub ich fragmentów (np. dup(1q) w BL).

Należy przy tym pamiętać, że analiza kariotypowa pozwala na ocenę całego genomu komórki białaczkowej, ujawniając wszystkie występujące aberracje, ale tylko wówczas, gdy przemieszczony materiał jest nie mniejszy niż kilka milionów par zasad (minimum 1- 5 Mpz DNA). Na szczęście metody cytogenetyki molekularnej, oparte o technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) charakteryzują się wyższą rozdzielczością. Współczesne możliwości techniczne pozwalają cytogenetykowi oceniać status pojedynczych genów czy wybranych regionów DNA tak w chromosomach metafazowych jak w zdespiralizowanej nici DNA jąder interfazowych.

### **13.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z użyciem specyficznych sond DNA**

Technika FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) umożliwia detekcję stonkowo małych zmian, nawet o wielkości poniżej 100 tysięcy par zasad (<100 Kpz). Tak niewielkie mogą być diagnostyczne sondy molekularne, których długość skorelowana jest z obszarem badanego genu. Dzięki technice FISH można wykrywać ilościowe i strukturalne aberracje nie tylko w metafazach, ale też w jądrach interfazowych badanych komórek [7]. Oznaczony fluoroforem odcinek DNA nazwany „sondą”, posiada zdolność do hybrydyzacji (specyficznego wiązania) z taką samą sekwencją DNA komórki nowotworowej pacjenta. Sondy mogą znakować obszary różnej wielkości: od całego chromosomu do pojedynczego genu (Rycina 13.2). Zaburzenia badanych genów w komórce nowotworowej: zmiana liczby kopii genu (utrata bądź powielenie) czy też zaburzenia struktury genu (rearanżacja bądź fuzja) mają w określonej sytuacji klinicznej znaczenie diagnostyczne. Zastosowanie różnych barwników fluorescencyjnych pozwala na równoczesną detekcję kilku obszarów DNA, a uzyskany obraz uwidacznia położenie i wzajemne relacje badanych genów czy chromosomów. Dodatkową zaletą tej metody jest jej użyteczność w badaniu materiału archiwalnego (skrawki parafinowe), gdzie możliwa jest jedynie analiza jąder interfazowych. Przy użyciu sond genowo specyficznych można w takim materiale ocenić status wybranych genów (technika i-FISH). Analiza obrazu FISH odbywa się w mikroskopie fluorescencyjnym, zwykle połączonym z komputerowym systemem analizy obrazu,

### 13.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) z użyciem specyficznych sond DNA



Rycina 13.2: Przykłady znakowania FISH.

A. i-FISH przy zastosowaniu sond genowo specyficznych (LSI BCR/ABL DC DF, Vysis). Jądro interfazowe komórki szpiku pacjenta z przewlekłą białaczką szpikową. Strzałki wskazują dwa kolokalizacyjne sygnały fuzyjnyjne. Znakowanie czerwone odpowiada genowi *ABL*, zielone - genowi *BCR*.

B. Metafaza komórki nowotworu z komórek dendrytycznych. Zastosowano sondy znakujących całe chromosomy (sondy malujące, Kreatech). Widoczna translokacja (strzałka) pomiędzy chromosomem 5 (znakowanie zielone) i chromosomem 11 (znakowanie czerwone).

wyposażonym w „moduł FISH”. Ocena wzoru znakowania jest obwarowana licznymi wskazaniem (granica błędu zależna m.in. od typu użytej sondy czy rodzaju nowotworu; liczba analizowanych komórek w zależności od rodzaju zmiany itp.) Rozpoznanie zaburzenia (np. „obecność fuzji” czy „delecja genu”) w przypadkach typowych jest jednoznaczne, jednak pełna interpretacja wyniku, zwłaszcza w przypadkach nietypowych, wymaga dużego doświadczenia. Wynik badania FISH dotyczy jedynie obszarów komplementarnych do użytej sondy DNA i powinien zawierać komplet informacji zgodnie zaleceniami krajowych i międzynarodowych towarzystw naukowych, zapis wyniku musi być zgodny z ostatnią dostępną edycją ISCN [3].

Dzięki technice FISH można jednoznacznie określić w komórkach nowotworowych obecność lub brak określonych, diagnostycznie użytecznych fuzji genowych np. *BCR/ABL*, *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* czy *CBFB/MYH11*. Analiza FISH pozwala także na ocenę liczby kopii badanych genów (delecje, powielenia), w tym statusu genów istotnych w stratyfikacji do grupy wysokiego ryzyka pacjentów np. ze szpiczakiem mnogim (utrata genu *TP53* czy fuzja *FGFR3/IGH*).

Zaawansowanymi odmianami techniki FISH są porównawcza hybrydyzacja genomowa (ang. *comparative genomic hybridization*, CGH) i wysokorozdzielcza CGH (ang. *array comparative genomic hybridization*, a-CGH). Porównawcza hybrydyzacja jest metodą badania genomu, opartą na hybrydyzacji analizowanego DNA komórki nowotworowej oraz DNA normalnego do prawidłowych chromosomów. Rozdzielczość chromosomowego CGH jest zróżnicowana w zależności

od rodzaju badanego uszkodzenia. W przypadku delecji wykazuje utraty obszarów ok. 5-10 Mpz. Detekcja 5-10-krotnej amplifikacji jest możliwa dla obszarów ok. 1 Mpz, zaś przy wysokim stopniu amplifikacji można wykryć powielenia mniejszych regionów (ok. 100 Kpz). Wysokorozdzielcza CGH (macierze CGH) wykorzystuje hybrydyzację DNA pacjenta do zaplanowanego spektrum referencyjnego DNA (mikromacierz). Ta ostatnia metoda znacznie przewyższa czułość innych technik cytogenetycznych. Pozwala na wychwycenie utrat/powieleń w obszarach już od kilkudziesięciu Kpz, co jest możliwe dzięki zastąpieniu chromosomów klonami BAC, cDNA lub oligonukleotydami. Techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej pozwalają szczegółowo określić ilościowe zmiany materiału genetycznego w komórkach nowotworu, nie wykazują jednak zrównoważonych zmian strukturalnych, takich jak translokacje wzajemne.

### 13.4. Procedury diagnostyki cytogenetycznej w hematologii

Wykrycie i określenie składu zaburzeń kariotypowych, poparte badaniami z zastosowaniem metod cytogenetyki molekularnej, pozwala specjalście na określenie rodzaju genetycznych aberracji występujących w badanych komórkach nowotworowych. Zaburzenie fizjologicznej czynności komórek szpiku w wyniku specyficznych translokacji, jest źródłem powstawania wielu typów białaczek, w których powstanie określonych genów fuzyjnych powoduje zaburzenie funkcjonowania odpowiednich szlaków metabolicznych (Tabela 13.1).

Poznanie genetycznych mechanizmów powstawania nowotworu zapoczątkowało określenie translokacji t(9;22), jako zmiany związanej z przewlekłą białaczką szpikową (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML). Jej odkrycie było pierwszą obserwacją związku między specyficzną zmianą chromosomową a określonym typem nowotworu [8]. Miejscami pęknięć w przypadku tej translokacji są: w chromosomie 9 region obejmujący gen *ABL* (prążek q34) i w chromosomie 22 region genu *BCR* (prążek q11). Rezultatem translokacji wzajemnej jest utworzenie fuzyjnego genu *BCR/ABL*, którego produkt: patogenne białko p210<sup>bcr-abl</sup> (wyjątkowo 190<sup>bcr-abl</sup> lub 230<sup>bcr-abl</sup>), wykazuje podwyższoną aktywność kinazy tyrozynowej [9, 10]. Zjawiska te są przyczyną powstania klinicznego obrazu przewlekłej białaczki szpikowej.

Niekiedy ta sama aberracja występuje w różnych typach rozrostów, powodując odmienne skutki biologiczne. Translokacja t(9;22)(q34;q11), wykrywana jest także u ok. 10-30% pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL) jako zmiana wtórna, wskazująca na niekorzystną prognozę [11]. A zatem, oprócz stwierdzenia faktu obecności aberracji w komórkach nowotworu i odsetka komórek ze zmianą, niezmiernie istotna jest prawidłowa interpretacja uzyskanych danych w kontekście klinicznym. Interpretacja, dokonywana na podstawie współczesnej wiedzy i w oparciu o obowiązujące zasady diagnostyczne, ocenia możliwe skutki kliniczne takich nieprawidłowości i ma podstawowe znaczenie w rozpoznawaniu, a często także w prognozowaniu przebiegu i planowaniu terapii białaczek i chłoniaków [12–16].

Tabela 13.1: Typowe aberracje chromosomowe w wybranych białaczkach.

Typ rozrostu nowotworowego	Aberracja Zaburzenie genowe	Znaczenie kliniczne
Przewlekła białaczka szpikowa	t(9;22)(q34;q11) fuzja <i>BCR/ABL</i>  i(17), +Ph	diagnostyczne, wskazanie do leczenia inhibitorami kinaz, monitorowanie leczenia; zmiany wtórne pogarszające rokowanie
Ostra białaczka limfoblastyczna	t(9;22)(q34;q11)	czynnik złego rokowania
Przewlekła białaczka neutrofilowa	10% z aberracjami cytogenet. Zmiany niespecyficzne: +8, +9, +21, del(20q), del(11q), del(12p) BRAK t(9;22) <i>BCR/ABL</i>	–  obecność fuzji <i>BCR/ABL</i> wyklucza diagnozę, obecność fuzji wskazuje na nietypową CML z p230
Czerwieńca prawdziwa	20% z aberracjami cytogenet. Zmiany niespecyficzne: +8, +9, del(20q), del(13q), del(9p) BRAK t(9;22) <i>BCR/ABL</i> w progresji: >95% mutacja <i>JAK2</i>	niemal wszystkie przypadki z aberracjami rozwijają MDS/AML;  obecność fuzji <i>BCR/ABL</i> wyklucza diagnozę;
Nadpłytkowość samoistna	5-10% z aberracjami Zmiany niespecyficzne: +8, 5q-, del(9q), 20q-, BRAK t(9;22) <i>BCR/ABL</i>	jeśli widoczne 5q- należy różnicować z MDS  obecność fuzji <i>BCR/ABL</i> wyklucza diagnozę
Przewlekła białaczka eozynofilowa	del(4)(q12)* fuzja <i>FIP1L1/PDGFR</i>	diagnostyczne, wskazanie do leczenia inhibitorami kinaz
Ostra białaczka szpikowa z t(15;17)	t(15;17)(q22;q12) fuzja <i>PML/RARA</i>	diagnostyczne, dobre rokowanie, wskazanie do leczenia ATRA
Ostra białaczka szpikowa z t(8;21)	t(8;21)(q22;q22) fuzja <i>RUNX1/RUNX1T1</i> ( <i>AML1/ETO</i> )	diagnostyczne, dobre rokowanie; tylko mutacja <i>KIT</i> pogarsza rokowanie
Ostra białaczka szpikowa z t(6;9)(p23;q34)	t(6;9)(p23;q34)* fuzja <i>DEK/NUP214(CAN)</i>	diagnostyczne, złe rokowanie

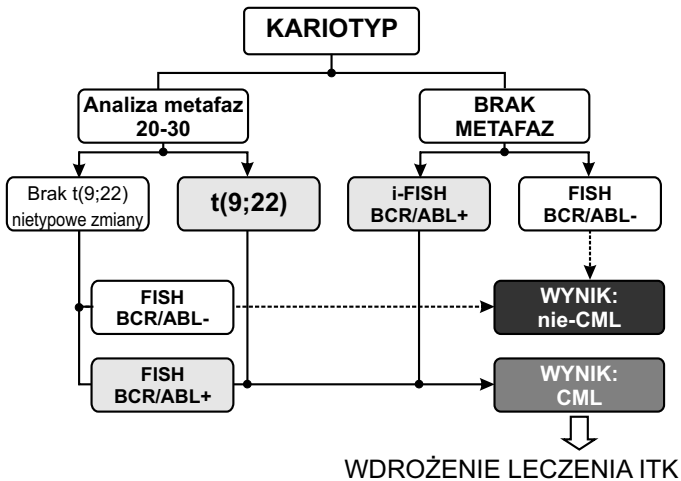
\*niewidoczne (lub trudne do uchwycenia) w badaniu kariotypowym

W diagnostyce hematologicznej cytogenetyczne metody diagnostyczne stosowane są zwykle równolegle, ponieważ ekspertyza uzyskana przy użyciu jed-

nej z nich może być niewystarczająca lub niepełna. Precyzyjna ocena statusu wybranych genów w technice FISH nie mówi nic o ewentualnie istniejących w komórce innych aberracjach, zaś całościowa informacja uzyskana podczas kariotypowania jest znacznie mniej szczegółowa ze względu na stosunkowo niską rozdzielczość metody. Szczególnie w przypadku diagnozy różnicowej bądź niepewności co do rozpoznania, dopiero uzupełniające się wyniki kariotypowania i-FISH pozwalają na uzyskanie miarodajnej opinii. W określonych rozrostach hematologicznych zaakceptowano określony tryb postępowania diagnostycznego, gdzie obecność (lub brak) określonej aberracji w podstawowym badaniu kariotypu obliguje diagnostę do poszukiwań określonych aberracji metodą FISH [17].

### 13.4.1. Przykładowa diagnostyka

Diagnoza przewlekłej białaczki szpikowej wymaga potwierdzenia obecności specyficznej translokacji  $t(9;22)(q34q11)$  w badaniu kariotypu (cytogenetyka klasyczna), gdzie wyróżnia się nieprawidłowe kopie chromosomów 9 i 22 (Rycina 13.1). Fuzję genową *BCR/ABL* ujawnia się w badaniu techniką FISH (Rycina 13.2A), a patognomiczny produkt białkowy - w badaniu zróżnicowanymi technikami PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Wykazanie obecności tych zmian potwierdza diagnozę przewlekłej białaczki szpikowej, zaś ich brak - definitywnie wyklucza rozpoznanie CML (Rycina 13.3).



Rycina 13.3: Schemat analizy cytogenetycznej w przewlekłej białaczce szpikowej.

Typową translokację  $t(9;22)(q34q11)$  lub jej warianty wykrywa się w badaniu kariotypowym u około 90% pacjentów z CML. Jeśli jednak nie uzyska się metafaz lub jeśli nie stwierdzi się obecności oczekiwanej aberracji - konieczne jest uzupełnienie oceny techniką FISH z sondą znakująca geny *BCR* i *ABL*. Badanie FISH jednoznacznie wykrywa obecność genu fuzyjnego. W komórkach białaczkowych znakowanie *BCR/ABL+* ujawnia się zarówno w jądrach interfazowych (i-FISH) jak i w metafazach z nietypowymi aberracjami, prowadzącymi do ukry-

tej (niewidocznej w kariotypie) fuzji genowej. Fuzja (*BCR/ABL+*), w przypadkach CML z brakiem translokacji t(9;22), powstaje zwykle w wyniku insercji genu *ABL* w pobliżu genu *BCR* na chromosomie 22. Wówczas to, pozornie morfologicznie normalny chromosom 22 produkuje chimeryczne białko BCR/ABL.

W diagnostyce przewlekłej białaczki szpikowej należy jednak dążyć do pełnej oceny kariotypu, która pozwala na równoczesne wykrycie ewentualnych zmian wtórnych. Oznaczona w trakcie diagnostyki cytogenetycznej aberracja pierwotna jest też indykatorem przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie. Odsetek komórek z translokacją (9;22) lub fuzją *BCR/ABL* określa stopień remisji cytogenetycznej, obligatoryjnie oznaczany w trakcie leczenia.

Genetyczne zdefiniowanie choroby nowotworowej jest niezbędne w przypadku stosowania nowej strategii leczenia: terapii celowanej. Leczenie celowane to farmakologiczne oddziaływanie na cele cząsteczkowe, mające zasadniczą rolę w powstawaniu i rozwoju danego nowotworu. Lek molekularnie celowany atakuje wybiórczo komórki nowotworu, nie powodując uszkodzeń komórek prawidłowych. Pierwszym skutecznym lekiem tej grupy był Imatinib (inne nazwy Gleevec, Gleevec), inhibitor kinazy tyrozynowej, stosowany dziś powszechnie w leczeniu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. Zatem brak celu komórkowego (nieprawidłowego białka BCR/ABL) w przypadku zastosowania ITK w nie-CML skutkować będzie niepowodzeniem leczenia. Detekcja obecności translokacji t(9;22)(q34;q11) z fuzją *BCR/ABL1* jest więc nie tylko niezbędnym warunkiem prawidłowej diagnozy, ale też warunkiem wdrożenia skutecznego leczenia [18].

## 13.5. Podsumowanie

Wykrycie i określenie składu aberracji kariotypowych, poparte zdefiniowaniem zaburzeń genowych metodami cytogenetyki molekularnej, pozwala na określenie rodzaju genetycznych zmian występujących w badanych komórkach nowotworu. Informacja ta ma podstawowe znaczenie w diagnostyce większości białaczek i chłoniaków. Optymalizacja procedur stosowanych w laboratoriach cytogenetycznych ma zatem w hematologii kluczowe znaczenie dla powodzenia leczenia.

## Literatura

- [1] Sverdlow S.H., Campo E., Harris N.L. i wsp. (red.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, 2008.
- [2] Tjio J.H., Levan A.: The chromosome number of man. *Hereditas.* (42), 1956: 1-6
- [3] Schaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J (eds): ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, 2009
- [4] Wang H.C., Fedoroff S.: Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* (235), 1972: 52-54
- [5] E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics Society, Access July 2012. <http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit1/guidelines/cytogenetics/index.xhtml>



### 13. *Badania technikami cytogenetyki klasycznej...*

- [6] Pieńkowska-Grela B. (red): Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych. Poradnik. Sekcja Cytogenetyki Hematologicznej PTGC, Warszawa 2004
- [7] Pinkel D., Straume T., Gray J.W.: Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* (83), 1986: 2934-2938
- [8] Nowell P.C., Hungerford D.A.: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497
- [9] Rowley J.D.: The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 495-519
- [10] Heisterkamp N., Groffen J.: Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol.* 1991; 5(1): 1-10
- [11] Heerema N.A., Harbott J., Galimberti S. i wsp.: Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. *Leukemia*, 2004; 18: 693-702
- [12] Dwilewicz-Trojaczek J., Deptała A., Hellmann A., Mądry K., Podolak-Dawidziak M., Warzocha K.: Diagnostyka, klasyfikacja i leczenie zespołów mielodysplastycznych: zalecenia ekspertów polskich. *Acta Haematol. Pol.* (41), 2010: 101-114
- [13] Hołowiecki J.: Nowotwory z limfoidalnych komórek prekursorowych. Ostre białaczki limfoblastyczne w Krzakowski M. (red). Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. *Via Medica*, Warszawa, 2009
- [14] Gałązka K., Mioduszevska O., Maryniak R., Ziarkiewicz-Wróblewska B., Rymkiewicz G., Pieńkowska-Grela B. i wsp.: Podstawowe zasady i organizacja diagnostyki patologicznej chłoniaków. *Polish Journal Pathology*, 58(3), 2007: 1-14
- [15] Hołowiecki J.: Ostre białaczki szpikowe (Polska Grupa ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych — PALG). Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych, 2009
- [16] Preizner W., Sacha T., Salamanczuk Z., Pieńkowska-Grela B., Haus O., Hellmann A.: Standard postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z przewlekłą białaczką szpikową w Polsce. *Acta Hematologica Polonica* (30), 2008: 107-122
- [17] Haeflacher C., Rieder H., Lillington D.M., Dastugue N., Hagemajjer A., Harbott J. i wsp.: Proposal for standardization protocols for cytogenetic analyses of AML, CLL, CML CMD i MDS, *Genes Chromosom Cancer* 2007, 46: 494-499
- [18] Recommendations European LeukemiaNet for the Management of CML. Update 2010. [http://www.eutos.org/content/home/news/download\\_material/e1023/infoboxContent1024/PocketCard\\_2010\\_final.pdf](http://www.eutos.org/content/home/news/download_material/e1023/infoboxContent1024/PocketCard_2010_final.pdf)

# ABERRACJE STRUKTURALNE DNA W NOWOTWOROWYCH ROZROSTACH Z KOMÓRKI MACIERZYTEJ HEMATOPOEZY

Marta Libura, Marta Przestrzelska, Marta Więsik,  
Karolina Karabin, Patrycja Rybarczyk, Albert Moskowicz

*Pracownia Diagnostyki Molekularnej BKK Klinika Hematologii, Onkologii  
i Chorób Wewnętrznych SPCSK WUM Warszawa*

## Streszczenie

W ostatnich latach dokonał się istotny postęp w leczeniu hematologicznych rozrostów nowotworowych. Postęp ten nie byłby możliwy bez rozwoju diagnostyki. Diagnostowanie molekularnego podłoża choroby, w tym z zastosowaniem wysoko-rozdzielczych technik genetycznych, umożliwia z jednej strony podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych, z drugiej, stratyfikuje prognozę i pozwala na włączenie bądź odstąpienie od agresywnych procedur. Większość stosowanych w diagnostyce molekularnej metod oparta jest o łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) z następującą wizualizacją produktów PCR. W zależności od typu aberracji: i) aberracje związane z przemieszczeniem dużych fragmentów DNA (np. translokacje chromosomowe); ii) mutacje wewnątrzgenowe, stosuje się różne techniki wizualizacji. Produkty amplifikacji genów fuzyjnych są poddawane wizualizacji w żelu agarozowym, podczas gdy detekcja np. substytucji pojedynczego nukleotydu wymaga zastosowania sekwenatora, umożliwiającego określenie zmian genetycznych z rozdzielnością do 1 pary zasad. Obok etapu diagnostycznego, techniki molekularne znajdują swoje zastosowanie w monitorowaniu postępów leczenia, w szczególności w śledzeniu choroby resztkowej. Jest to możliwe dzięki wysokiej czułości reakcji PCR, która umożliwia wykrycie 1 komórki chora na milion komórek zdrowych. Ponieważ lista markerów molekularnych ciągle rośnie, niezbędnym jest proces standaryzacji oraz doboru do rutynowych oznaczeń jedynie tych aberracji, których znaczenie prognostyczne zostało potwierdzone w ramach wielośrodkowych prób klinicznych.

*Słowa kluczowe:* PCR, genetyka, diagnostyka molekularna, geny fuzyjne, rearanżacje wewnątrzgenowe

## 14.1. Wstęp

Punktem wyjściowym dla każdego rozrostu nowotworowego jest powstanie mutacji DNA, która w następstwie zmienia funkcję genów życiowo ważnych. Aberracja DNA w swoim następstwie inicjuje proces transformacji nowotworowej tj. określone zmiany fenotypu komórki, prowadzące do niekontrolowanych podziałów, bloku różnicowania oraz zahamowania odpowiedzi na bodźce apoptotyczne. W procesie transformacji dochodzi do zaburzeń wielu szlaków metabolicznych komórki m.in. procesu metylacji DNA, ekspresji genów oraz mikro-RNA, procesu rozkładania białek (tzw. *turnover*).

Podłoże genetyczne rozrostów hematologicznych jest wysoce heterogenne. Wiele zmian genetycznych nie zostało z pewnością do tej pory opisanych. Strukturalne aberracje materiału genetycznego, odpowiedzialne za transformację komórki macierzystej hematopoezy są klasyfikowane jako: i) aberracje związane z przemieszczeniem dużych fragmentów DNA (tzw. „duże” aberracje) - widoczne pod mikroskopem świetlnym w klasycznym badaniu cytogenetycznym jako translokacje chromosomowe, duże delecje, inwersje, insercje etc; ii) mutacje wewnątrzgenowe, które pozostają niewidoczne w mikroskopie świetlnym (tzw. kariotyp prawidłowy; *normal kariotype* NK), i polegają na zmianach sekwencji w obrębie jednego genu: mikro-delecje, -inwersje, -insercje –duplikacje, mutacje punktowe. O ile „duże” aberracje materiału genetycznego są technicznie prostsze w analizie, o tyle detekcja rearanżacji wewnątrzgenowych – wymaga bardziej skomplikowanych metod, często zakładających rozdzielczość na poziomie jednej pary zasady. Metody umożliwiające detekcję „dużych” aberracji to: i) *metody cytogenetyczne* oraz ii) *molekularne* oparte o łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) z następową wizualizacją produktów PCR w żelu agarozowym. Ta ostatnia metoda umożliwia detekcję jedynie translokacji, w tym tych, które prowadzą do ekspresji genów fuzyjnych. Natomiast przy pomocy PCR nie możliwa jest detekcja ubytków lub amplifikacji materiału genetycznego (duże delecje, amplifikacje, insercje etc), które podlegają detekcji metodami cytogenetyki klasycznej. Badanie genów fuzyjnych przy pomocy PCR wydaje się prostym zadaniem, ponieważ detekcji podlega patologiczny produkt, który nie występuje w zdrowej komórce. Stąd badanie metodą PCR osiąga tu wysoką czułość (do  $10^{-6}$  tj. 1 komórka patologiczna na 1 000 000 komórek zdrowych), co wykorzystywane jest w monitorowaniu choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*, MRD). Natomiast aberracje wewnątrzgenowe dotyczą małego obszaru DNA - często pojedynczej zasady, i występują najczęściej w jednym allelu badanego genu (heterozygota). Detekcja polega zatem na ocenie patologicznej sekwencji genu, który współistnieje w mieszaninie cząsteczek DNA/RNA o prawidłowej sekwencji (tzw. dziki allel; *wildtype*); stąd wymagane są metody o stosunkowo dużej rozdzielczości, ale przez to o niższej czułości jeśli chodzi o ilościowe proporcje aberracji w badanym materiale. Wśród tych metod sekwencjonowanie pozostaje techniką referencyjną (czułość waha się w przedziale 10% - 20%). Natomiast do metod przesiewowych należy wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (dHPLC), wysokorozdzielcza analiza krzywych topnienia amplikonów (HRM), analiza długości fragmentów (GeneScan; dotyczy aber-

racji długości, za wyjątkiem mutacji punktowych), analiza fragmentów restrykcyjnych (RFLP), elektroforeza w podwójnym gradiencie gęstości i czynnika denaturującego (DGGE), konformacyjny polimorfizm jednoniciowego DNA (SSCP), PCR z zastosowaniem allelo-specyficznego primeru (ASO-PCR) i inne [1]. Dodatkowo, w grupie chorych z NK dokładniejszy wgląd w anomalie submikroskopowe jest możliwy dzięki nowym technikom molekularnym, takim jak metoda mikromacierzy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism arrays*, aSNP).

Jednostkami chorobowymi omawianymi w tym rozdziale są te rozrosty hematologiczne, dla których oznaczanie wybranych aberracji genetycznych posiada udokumentowane znaczenie kliniczne, a dodatkowo możliwości ich badań mieszczą się w publicznym budżecie przewidzianym dla rutynowych oznaczeń diagnostyki molekularnej. Chorobami, które na dzisiejszy dzień spełniają te kliniczno - ekonomiczne kryteria są w głównej mierze: przewlekła i ostra białaczka szpikowa (PBSz, OBSz), jak również ostra białaczka limfoblastyczna (OBL).

## 14.2. Diagnostyka molekularna „dużych” aberracji w ostrej białaczce szpikowej (OBSZ)

W OBSz proces nowotworowy wywodzi się z komórek progenitorowych szpiku poprzez zaburzenie dwóch procesów: proliferacji i różnicowania. Według teorii „dwóch uderzeń” (ang. *two-hit model of leukemogenesis*) do rozwoju pełnoobjawowej OBSz dochodzi w dwóch etapach: z jednej strony aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych (ang. *tyrosine kinase*, TK), kodowanych np. przez geny *FLT3*, *C-KIT* oraz mutacji genów czynników transkrypcyjnych (*CBF*, *MLL*, *RARA*, *EVI1*, *CEBPA*, *TEL*, itd.), które blokują dojrzewanie progenitorów, ze znikomym wpływem na ich proliferację [2, 3].

Klasyczny podział OBSz powstały w oparciu o wyniki badania cytogenetycznego umożliwia wyodrębnienie trzech grup chorych o różnym rokowaniu [4]: chorzy z korzystnym (15-30% OBSz), niekorzystnym (10-30%) oraz pośrednim rokowaniem (40-60% OBSz).

Klasyczne aberracje korzystnie rokujące,  $t(8;21)/AML1-ETO$ ;  $inv(16)/CBF\beta-MYH11$ , lub  $t(16;16)$ ; oraz  $t(15;17)$  definiują w miarę jednorodną grupę białaczek o morfologii odpowiednio M2 (OBSz z cechami dojrzewania), M4Eo (ostra białaczka mielomonocytoza z zaburzeniami eozynocytopeny), oraz M3 (ostra białaczka promielocytowa). Na osobną uwagę zasługują białaczki z rearanżacją genu *CBF $\alpha$*  lub *CBF $\beta$* , czyli wykazujące ekspresję genów fuzyjnych: *AML1/CBF $\alpha$ -ETO* (inna nazwa genów wchodzących w skład tej fuzyji genowej: to *RUNX1-RUNX1T1*) lub *CBF $\beta$ -MYH11*. Białaczki te zwane są *core binding factor* OBSz (*CBF-OBSz*) i, pomimo że wykazują różnice w fenotypie (M2 vs M4Eo), mechanizm ich transformacji oraz rokowanie są zbliżone. Translokacja  $t(15;17)(q22;q12-21)$  *PML-RARA* odpowiada za molekularne przyczyny powstania ostrej białaczki promielocytowej (OBSz M3). Gen *RARA* koduje receptor kwasu  $\alpha$ -retinowego, stąd w terapii białaczki promielocytowej wykorzystywany jest preparat ATRA (*all-trans retinoic acid*). Bardzo rzadkimi przypadkami białaczek, w których bie-

rze udział gen receptora kwasu  $\alpha$ -retinowego (*RARA*) są m.in. t(5,17)(q35;q21)/*NPM1-RARA* oraz t(11,17)(q13;q21)/*NUMA-RARA* – oba białka związane z wrażliwością na ATRA, jak również wariant oporny na leczenie kwasem retinowym: t(11;17)(q23;q21)/*PLZF-RARA* [5].

Do niekorzystnie rokujących aberracji zalicza się m.in. aberracje obejmujące gen *MLL* (11q23), delecje długich ramion i monosomie chromosomów 5 i 7 (-5/5q-, -7/7q-), translokacje 3q21 i 3q26, t(6;9)(p23;q34)/*DEK-CAN*, t(8;16)(p11;p13)/*MOZ-CBP* oraz mnogie aberracje chromosomowe, składające się na tzw. kariotyp złożony. Z przedstawionych powyżej aberracji jedynie fuzje genu *MLL*, *DEK-CAN*, *MOZ-CBP* są oznaczane metodami molekularnymi, podczas gdy reszta zmian podlega detekcji w rutynowo zlecanym badaniu cytogenetycznym.

Chorzy z prawidłowym kariotypem, bez widocznych w mikroskopie świetlnym aberracji wykazują pośrednie ryzyko nawrotu choroby.

### 14.3. Rozszerzona diagnostyka rearanżacji wewnątrzgenowych w białaczkach NK-OBSz

Ostatnie badania wykazały, że zarówno w grupie chorych z prawidłowym kariotypem (ang. *normal karyotype*, NK) chorzy mogą być poddani dalszej genetycznej stratyfikacji rokowania z zastosowaniem metod diagnostyki molekularnej [3]. W obrębie podgrupy NK-OBSz najczęściej występująca mutacja dotyczy genu *NPM1* (45-60% populacji NK-OBSz), kodującego nukleofosminę. Mutacje *NPM1* stanowią czynnik rokowania korzystnego, z wyjątkiem sytuacji, gdy mutacja współwystępuje z wewnętrzną tandemową duplikacją w genie *FLT3* (ang. *FLT3 internal tandem duplication*, *FLT3-ITD*). Korzystne rokowanie wykazują zatem jedynie pacjenci *NPM1*(+)/*FLT3-ITD* (-) [6].

Zmiany w sekwencji genu *CEBPA* występują u 5-10% chorych z NK-OBSz. Niewielkie delecje i insercje oraz mutacje punktowe dotyczą regionu C- i N-końcowego białka, prowadząc do zaburzenia jego funkcji i w związku z tym do zablokowania dojrzewania neutrofilów. Chorzy z aberracjami *CEBPA* zlokalizowanymi na obu allelach genu charakteryzują się szczególnie dobrą prognozą kliniczną, podczas gdy mutacje monoalleliczne wydają się nie mieć wpływu na rokowanie [7].

Obok znaczników molekularnych charakteryzujących się korzystnym rokowaniem w populacji NK-OBSz zidentyfikowano również szereg markerów molekularnych skorelowanych ze złym rokowaniem, a lista ta jest stale uzupełniana o nowe doniesienia. Z listy tej najważniejszą aberracją jest *FLT3-ITD*, która występuje w 35-45% populacji chorych z NK-OBSz. Do mutacji tej dochodzi w eksonach 14-15, które kodują domenę transbłonową receptora. Na skutek duplikacji pojawiają się zmiany konformacyjne, prowadzące do autosforylacji receptora i wzmożonej proliferacji komórek blastycznych. Obecność *FLT3-ITD* wiąże się ze zwiększonym prawdopodobieństwem niepowodzenia terapii i wznowy choroby. Odpowiedź na leczenie u chorych dodatkowo różnicuje stosunek ilościowy allela

zmutowanego do allele typu dzikiego. Szczególnie niekorzystna prognoza charakteryzuje pacjentów z przewagą allele zmutowanego [8].

Częściowa duplikacja genu *MLL* (*MLL*-PTD) stanowi kolejny marker niekorzystnego rokowania, występujący u ok. 10% chorych z grupy NK-OBSz. Duplikacja występuje pomiędzy eksonem 1, a 8 i powoduje konstytutywny wzrost proliferacji oraz potencjału odnawiania się komórek macierzystych hematopojezy.

Wewnątrzgenowe rearanżacje w *NPM1* i/lub *CEBPA* zostały określone w ostatniej wersji klasyfikacji WHO (2008) jako tzw. podjednostki robocze. Wg zaleceń grupy ELN (*European Leukemia Net*) rutynowa diagnostyka molekularna powinna obejmować mutacje w genach *NPM1*, *CEBPA* i *FLT3* u chorych z NK-OBSz. Dodatkowo, obok wymienionych aberracji, nowe markery prognostyczne w grupie chorych z NK-OBSz stały się przedmiotem prac badawczych, m.in. mutacje w genach: *WT1* (ok. 10-15% NK-OBSz), *RUNX1*, *IDH1* oraz *IDH2*, jak również *TET2* - kojarzone z niekorzystnym rokowaniem klinicznym w wybranych podgrupach genetycznych NK-OBSz [9]. Ciekawym faktem jest obserwacja, iż geny *IDH1/2* oraz gen *TET2* są związane bezpośrednio z procesem metylacji DNA, ingerując w sposób pośredni w ekspresję genów życiowo ważnych dla komórki.

## 14.4. Diagnostyka genetyczna w ostrej białaczce limfoblastycznej (OBL)

Ostre białaczki limfoblastyczne stanowią heterogenną grupę chorób nowotworowych, występujących u dzieci i dorosłych. OBL charakteryzują liczne zaburzenia genetyczne, które definiują jej poszczególne podtypy, różniące się od siebie pod względem cytomorfologii, immunofenotypu, a także odpowiedzi na terapię i ryzyka nawrotu. Genetyka OBL związana jest z zaburzeniem procesu wczesnego różnicowania komórki limfocyta, na etapie rearanżacji łańcucha immunoglobulin lub receptorów TCR. Odsetki poszczególnych podtypów genetycznych różnią się u dzieci oraz u dorosłych. Na podstawie charakterystyki immunofenotypowej wyróżnia się B-prekursorową OBL (B-OBL) oraz ostrą białaczkę limfoblastyczną z linii komórek T (T-OBL). W OBL linii B-komórkowej, która stanowi zdecydowaną większość wszystkich białaczek limfoblastycznych, stwierdza się występowanie kilku podklas genetycznych [10]. Najczęściej pojawiającą się translokacją chromosomową u dorosłych pacjentów z OBL (ok. 30% przypadków), a tym samym mającą największe znaczenie w rutynowej diagnostyce molekularnej - jest chromosom Philadelphia (Ph) powstający w wyniku aberracji t(9;22)(q34;q11). Aberracji towarzyszy ekspresja genu fuzyjnego *BCR-ABL1*, który koduje konstytutywnie aktywny enzym – kinazę tyrozynową *BCR-ABL1* [11]. U dzieci odsetek białaczek Ph(+) OBL wynosi 5%. W obrębie genu *BCR* istnieje kilka miejsc złamania: jeżeli dojdzie do niego w tzw. większym miejscu złamania M-*BCR* (*major BCR*), powstaje białko p210; w miejscu mniejszego złamania m-*BCR* (*minor BCR*) powstaje białko p190. U większości chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną powstaje białko p190 (m-*BCR*). Pojawienie się transkryptu *BCR-ABL1* u pacjentów z OBL świadczy o złym rokowaniu. Pozostałe podgrupy związane są z obecnością aberracji: t(12;21)/ *TEL-AML1*, rearanżacji *MLL*, t(1;19)/ *E2A-PBX1*, występo-

waniem hiperdiploidii >50 chromosomów, hipoploidii, jak również rzadką anomalią jaką jest wewnątrzchromosomalna amplifikacja chromosomu 21 (*iAMP21*). Detekcja trzech ostatnich aberracji genetycznych jest możliwa z pomocą technik cytogenetycznych, lub cytofluorymetrii (hipo- i hiperploidia). Obok  $t(9;22)/BCR-ABL1$ , spośród wymienionych aberracji do niekorzystnie rokujących zmian zaliczamy: translokacje genu *MLL*,  $t(1;19)/E2A-PBX1$ , wewnątrzchromosomalną amplifikację chromosomu 21 (*iAMP21*). Aberracje te odpowiadają u dzieci za ok. 10% wszystkich B-OBL, podczas gdy u dorosłych za ok. 25-35%. Badania wykazały, że dodatkowo ok. 10-15% przypadków z B-OBL bez zaburzeń na poziomie cytogenetycznym (tzw. kariotyp prawidłowy udokumentowany w klasycznym badaniu cytogenetycznym, NK-OBL) również wykazuje niekorzystne rokowanie. W grupie białaczek NK-OBL, podobnie jak w przypadku NK-OBSz, pogłębiona charakterystyka molekularna pozwoliła na dalszą stratyfikację rokowania wraz z identyfikacją rearanżacji wewnątrzgenowych związanych ze zwiększonym ryzykiem nawrotów [12]. Szczególnie niekorzystne rokowniczo znaczenie przypisuje się mutacjom w obrębie genu *IKZF1* (*IKAROS*). Białaczka NK B-OBL cechująca się mutacją genu *IKZF1* została wyodrębniona jako nowy podtyp B-OBL o nazwie: *BCR-ABL1-like* OBL [13]. Okazuje się bowiem, że ta grupa OBL przedstawia profil ekspresji genów podobny do reprezentowanego przez białaczki B-OBL *BCR-ABL1*-pozytywne, z tą różnicą, że nie wykrywa się w nich translokacji  $t(9;22)$ . Białaczka *BCR-ABL1-like* OBL wykazuje rokowanie zbliżone do *BCR-ABL1* (+) B-OBL. Jak wskazują powyższe dane, diagnostyka mutacji *IKZF1* w ramach rutynowych oznaczeń u chorych z B-OBL może przedstawiać kliniczne znaczenie dla pacjenta. Jednak detekcje rearanżacji wewnątrzgenowych *IKZF1* nie należą do prostych technicznie, ich diagnostyka w formie testów przesiewowych jest w trakcie dopracowywania. W diagnostyce molekularnej białaczki OBL pochodzącej z komórek T, szczególne znaczenie z punktu widzenia klinicznego przedstawia translokacja *NUP214-ABL1* angażująca gen *ABL1*. Jak zostało to przedstawione w pierwszej części powyższego doniesienia, aberracje genu *ABL1* są charakterystyczne dla PBSz, oraz OBL wywodzącej się komórek B. Ekspresja genu *NUP214-ABL1* stanowi niespełna 5% przypadków z T-OBL, jednak jego detekcja przy pomocy technik diagnostyki molekularnej pozwala na selekcję pacjentów, którzy odniosą korzyść z terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej TKI [14].

#### **14.5. Diagnostyka oraz monitorowanie choroby resztkowej w przewlekłej białaczce szpikowej (PBSZ)**

Przewlekła białaczka szpikowa (PBSz) jest nowotworem mieloproliferacyjnym, którego istotą jest klonalny rozrost wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego, w 100% wywołany pojawieniem się chimerowego genu *BCR-ABL1*. U ponad 90% chorych na PBSz występuje skrócony chromosom 22 zwany chromosomem Philadelphia, powstający w wyniku wzajemnej translokacji ramion długich chromosomu 9 i 22,  $t(9;22)(q34;q11)$ , który może być wykrywany metodami klasycznej cytogenetyki. U chorych na PBSz przeważa typ transkryptu *BCR-ABL1* tzw. M-BCR z chimerycznym białkiem p210. W rzadkich przypadkach

PBSz miejsce pęknięcia znajduje się blisko końca 3' (*mikro BCR*) powstaje wówczas białko p230. Wprowadzony prawie dekadę temu imatinib, pierwszy inhibitor kinazy tyrozynowej (TKI) stał się lekiem pierwszego wyboru w fazie przewlekłej PBSz, podczas gdy TKI II generacji zwykle preferowane są w przypadku niepowodzenia leczenia imatinibem [15].

Zanim nadeszła era TKI, oszacowanie skuteczności leczenia na poziomie odpowiedzi hematologicznej (HR) i cytogenetycznej (CyR) wydawało się wystarczające. Obecnie, zgodnie z rekomendacją ekspertów ELN monitorowanie odpowiedzi na imatinib dokonuje się także poprzez ocenę odpowiedzi na poziomie molekularnym (MoLR). Szeroko stosowanym narzędziem do monitorowania minimalnej choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*, MRD) u pacjentów z PBSz jest technika ilościowej polimerazowej reakcji łańcuchowej w czasie rzeczywistym (RQ-PCR), która jest bardzo czułym narzędziem, pozwalającym wykryć 1 komórkę białaczkową na 100 000 zdrowych (tj. około 3-log czulsza niż standardowe techniki cytogenetyczne). Z uwagi na duże znaczenie kliniczne monitorowania genu *BCR-ABL1* podczas międzynarodowej konferencji w Bethesda w 2005 osiągnięto konsensus w sprawie ilościowego przedstawiania wyników. Ustalono, że wszystkie wyniki będą wyrażane w jednolitej międzynarodowej skali numerycznej IS, której punkty referencyjne zaproponowane w badaniu IRIS stanowią: standardowa linia bazowa definiowana jako 100% *BCR-ABL1*<sup>IS</sup> oraz standardowa wartość MMoLR (*major molecular response*) będąca redukcją transkryptu o 3-log względem linii bazowej tj. 0,1% *BCR-ABL1*<sup>IS</sup> [16]. Badanie IRIS wykazało, że osiągnięcie MMoLR w 12 miesiącu leczenia było związane ze 100% prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od transformacji w 60 miesiącu [17]. Wg konsensusu podjętego przez grupę ELN oznaczenia poziomu transkryptu *BCR-ABL1* u chorych leczonych inhibitorami TKI przeprowadza się we krwi wg następującego schematu: co 3 m-ce od początku leczenia, aż do osiągnięcia większej odpowiedzi molekularnej (MMoLR), a następnie co 6 m-cy.

Trudności w porównywaniu wyników między laboratoriami, spowodowane m.in. zróżnicowaniem stosowanych metod RQ-PCR - stworzyły konieczność międzylaboratoryjnej harmonizacji wyników badania RQ-PCR *BCR-ABL1*. Podczas międzynarodowej konferencji w Bethesda zaproponowano również wprowadzenie międzynarodowego czynnika korygującego (CF) specyficznego dla każdego ośrodka. Stąd konwersja wartości uzyskanych do IS przebiega wg wzoru:  $BCR-ABL1/gen\ kontrolny\ (np.\ ABL,\ GUS) \times 100\% \times CF = BCR-ABL1^{IS}$ .

Eksperci podczas konferencji Bethesda w 2005 uznali również badanie mutacji punktowych w domenie kinazowej jako standardowe badanie w ramach monitorowania odpowiedzi na TKI. Badania przesiewowe w kierunku mutacji w domenie kinazowej (KD) kinazy tyrozynowej *BCR-ABL* są rekomendowane przez ENL w przypadku niepowodzenia leczenia imatinibem lub suboptymalnej odpowiedzi [18].



## 14.6. Aberracje genetyczne leżące u podłoża przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych Ph(-)

Badania z zastosowaniem modelu zwierzęcego wykazały, że u podłoża wszystkich PNM leży mutagenna aktywacja kinaz tyrozynowych, bez komponenty bloku dojrzewania. U człowieka, przykładem genów aktywowanych mutagenie w PNM są takie TK, jak: *ABL*, *PDGFR $\beta$* , *PDGFR $\alpha$* , *JAK2*, *C-KIT* [19]. Obok klasycznego przykładu przedstawionej już wcześniej białaczki PBSz z ekspresją genu *BCR-ABL1*, pozostałe Ph(-) PNM charakteryzują się obecnością albo translokacji chromosomowej z towarzyszącym genem fuzyjnym, albo rearanzacji wewnątrzgenowej z udziałem wyżej wymienionych TK. Przykładem jest aberracja t(5;12)(q31;p13)/ *FIP1L1-PDGFR $\alpha$* , która występuje w przewlekłej białaczce eozynofilowej, lub t(5;12)(q33;p13)/ *TEL-PDGFR $\beta$*  towarzysząca przewlekłej białaczce mielomonocytozowej. Detekcja obu genów fuzyjnych kodujących receptor dla płytkowego czynnika wzrostu, choć rzadko stwierdzana w laboratoryjnej praktyce - pozwala ustalić wskazanie do rozpoczęcia terapii preparatem TKI. W przypadku przewlekłej białaczki eozynofilowej, ze względu na jej szczególnie niekorzystny przebieg kliniczny, związany z destrukcyjnym wpływem mediatorów tkankowych wydzielanych przez eozynofile – skuteczna terapia przy pomocy preparatu imatinib ma szczególne znaczenie. Kolejną mutacją przedstawiającą praktyczne znaczenie diagnostyczne jest mutacja *JAK2*, związana z *locus* V617F tego genu. Mutacja ta jest pomocna w diagnostyce różnicowej takich podjednostek chorobowych jak czerwienica prawdziwa (80% pozytywnych przypadków), osteomielifibroza (50% przypadków pozytywnych) oraz nadpłytkowość samoistna (20% pozytywnych przypadków). Mutacje w obrębie genu *C-KIT* D816V są kolejnym przykładem aktywującej mutacji, stwierdzanej w ponad 80% przypadków systemowej mastocytozy. Mutacje zarówno w genie *JAK2*, jak i *C-KIT* stanowią potencjalny obiekt terapii celowanej.

## 14.7. Podsumowanie

W ostatnich latach dokonał się istotny postęp w leczeniu hematologicznych rozrostów nowotworowych. Postęp ten nie byłby możliwy bez rozwoju diagnostyki. Diagnostowanie molekularnego podłoża choroby, w tym z zastosowaniem wysokorozdzielczych technik genetycznych, umożliwiła z jednej strony podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych, z drugiej, stratyfikuje prognozę i pozwala na włączenie bądź odstąpienie od agresywnych procedur. Mimo to, trwałą remisję uzyskuje ciągle jeszcze za mały odsetek chorych. Dodatkowo uboczne skutki stosowania agresywnych procedur terapeutycznych są czynnikiem ograniczającym ich stosowanie u znacznej grupy pacjentów. Stąd diagnostyka molekularna i genetyczna stanowią olbrzymie wezwanie dla współczesnej medycyny. Z jednej strony działka ta jest domeną intensywnych prac naukowych, z drugiej odnosi się do klinicznej sytuacji pacjenta leczonego w ramach publicznego systemu służby zdrowia. Stąd, ponieważ lista markerów molekularnych ciągle rośnie, finansowanie ich badania w ramach rutynowej diagnostyki powinno

być poddane weryfikacji i standaryzacji, z uwzględnieniem jedynie tych aberracji, których znaczenie prognostyczne zostało potwierdzone w ramach wieloośrodkowych prób klinicznych z uwzględnieniem rodzimych grup pacjentów danego kraju.

## Literatura

- [1] Chien J.H., Tang J.L., Chen R.L., Li C.C., Lee C.P. Detection of BCR-ABL gene mutations in Philadelphia chromosome positive leukemia patients resistant to STI-571 cancer therapy. *Leukemia Research*, 2008; 32: 1724-1734
- [2] Deguchi K., Gilliland D.G. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia*, 2002; 16: 740-744
- [3] Libura M., Haus O., Skotnicki A.B.: Mechanizmy genetyczne i markery molekularne transformacji nowotworowej w ostrej białaczce szpikowej u dorosłych: związek z klinicznym przebiegiem choroby, *Hematologia molekularna patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze*, red.: M. Witt T. Szczepański, M. Dawidowska. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań 2009; 39-55
- [4] Grimwade D., Walker H., Oliver F., i wsp.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 1998; 92: 2322-2333
- [5] Gulley M.L. Shea T.C., Fedorow Y. Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn*, 2010; 12:3-16
- [6] Schnittger S., Kern W., Tschulik C., i wsp.: Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 2009; 114: 2220-2231
- [7] Preudhomme C., Sagot C., Boissel N., i wsp.: Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, 2002; 100: 2717-2723
- [8] Withman S.P., Archer K.J., Feng L., i wsp.: Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*, 2001; 61: 7233-7239
- [9] Döhner H. Estey E.H., Amadori S., i wsp.: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*, 2010; 115: 453-74
- [10] Styczyński J., Gil L.: Ostra białaczka limfoblastyczna: różnice pomiędzy dziećmi i dorosłymi. *Acta Haematol. Pol.*, 2006; 37: 185-201
- [11] Cortes J., Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M.: Monitoring Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer*, 2011; 117: 1113-1122
- [12] Mullighan C., Goorha S., Radtke L., i wsp.: Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, 2007; 446: 758-764
- [13] Mullighan C., Su X., Zhang J., i wsp.: Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2009; 29: 470-480
- [14] Burmeister T., Gökbüget N., Reinhardt R., Rieder H., Hoelzer D., Schwartz S.: NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience. *Blood*, 2006; 108: 3556-9

14. *Aberracje strukturalne DNA w nowotworowych rozrostach ...*

- [15] Timothy H., Susan B.: Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2009: 477-487
- [16] M.C. Muller, C.P. Cross, P. Erben, T. i wsp.: Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*, 2009; 23:1957-1963
- [17] O'Brien S.G., Guilhot F, Larson R.A., i wsp.: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2003; 348: 994-1004
- [18] Baccarani M., Dreyling M.: Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2010; 2: v165-v16
- [19] Ritchie K.A., Aprikyan A.A., Bowen-Pope D.F. i wsp.: The Tel-PDGFR $\beta$  fusion gene produces a chronic myeloproliferative syndrome in transgenic mice. *Leukemia*, 1999; 13: 1790-803

# STR I REAL-TIME PCR METODY BADANIA CHIMERYZMU POPRZESZCZEPOWEGO

Anna Młynarczewska

*Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Klinika Hematologii, Onkologii  
i Chorób Wewnętrznych, SP CSK WUM, Warszawa*

## Streszczenie

Badanie chimeryzmu przeszczepowego to istotna część diagnostyki pacjenta po zabiegu transplantacji alogenicznych komórek krwiotwórczych. Pozwala na ocenę efektywności przeprowadzonej procedury oraz umożliwia zidentyfikowanie ewentualnej wznowy. Badanie to opiera się na analizie polimorfizmów genetycznych, do których należą polimorfizmy mikrosatelitarne wykorzystywane w metodzie STR-PCR oraz polimorfizmy typu insercja/delecja – służące do identyfikacji dawcy i biorcy za pomocą Real-Time PCR.

*Słowa kluczowe:* chimeryzm przeszczepowy, STR, Real-Time PCR

### 15.1. Wstęp

Przeszczepienie komórek krwiotwórczych, zarówno autologicznych (własnych, pobranych od pacjenta) jak i alogenicznych (od dawcy rodzinnego bądź niespokrewnionego) to procedura stosowana w leczeniu chorób układu hematopoetycznego oraz niektórych guzów litych (leczenie wspomagane jest podaniem własnych komórek krwiotwórczych). Jest to zabieg mocno obciążający organizm pacjenta i wiąże się z nim szereg powikłań. Należą do nich komplikacje wynikające z toksyczności stosowanego uwarunkowania przeszczepu, powikłania infekcyjne (w szczególności drobnoustrojami oportunistycznymi) oraz odrzucenie przeszczepu i wznowa choroby podstawowej. Z tego powodu niezwykle ważna jest diagnostyka, pozwalająca ocenić kinetykę odnowy immunologicznej pacjenta.

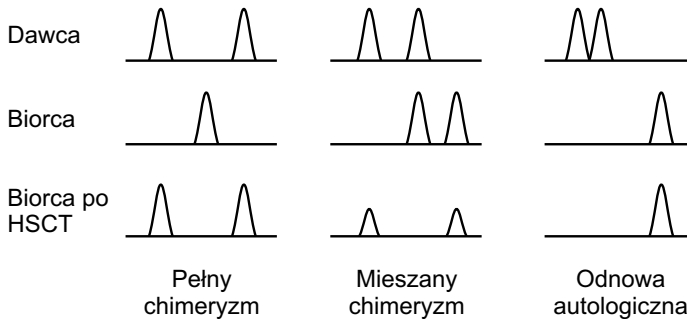
Do metod pozwalających na szybką ocenę parametrów chorego jest między innymi badanie przeszczepowego chimeryzmu, które pozwala ustalić czy w badanej próbce pobranej od pacjenta (szpiku bądź krwi) znajdują się przeszczepione komórki dawcy. Badanie to prowadzone jest na poziomie genomowego DNA. W wyniku badania można stwierdzić:

## 15. STR i real-time PCR metody badania chimeryzmu poprzyszczepowego

- pełny chimeryzm (ang. *complete chimerism*, CC) - obserwuje się, gdy w badanej próbce pobranej od pacjenta, obecne są tylko komórki dawcy,
- mieszany chimeryzm (ang. *mixed chimerism*, MC) to współistnienie komórek dawcy i komórek biorcy,
- odnowę autologiczną (ang. *autologous recovery*, AR) to brak chimeryzmu czyli obecność jedynie komórek z cechami pacjenta [1].

Najbardziej pożądanym jest pełny chimeryzm. Świadczy on o powodzeniu procedury przeszczepowej, o przyjęciu się przeszczepionych komórek krwiotwórczych dawcy. Występuje wówczas mniejsze ryzyko wznowy u biorcy a tym samym pacjent wolny jest od progresji choroby (ang. *progression-free survival*, PFS).

Mieszany chimeryzm może wystąpić we wczesnym etapie po transplantacji, szczególnie u pacjentów, u których podczas przygotowania do przeszczepienia nie zastosowano uwarunkowania mieloablacyjnego (Rycina 15.1). Jeżeli po pewnym czasie (czas jest uwarunkowany osobniczo i może wynosić od 30 do nawet 90 dni) chimeryzm mieszany przechodzi stopniowo w pełny chimeryzm – to jest to przejściowy mieszany chimeryzm (ang. *transient mixed chimerism*). Jeżeli jednak mieszany chimeryzm pojawia się po dłuższym czasie po transplantacji lub jest postępujący (ang. *progressive mixed chimerism*), tzn. w kolejnych badaniach zwiększa się odsetek komórek biorcy, wówczas istnieje większe ryzyko nawrotu choroby i niepowodzenia przeszczepu. Możliwe jest również wystąpienie trwałego mieszanego chimeryzmu (ang. *stable mixed chimerism*) kiedy badania prowadzone w czasie pokazują stały stosunek ilościowy komórek dawcy i biorcy [2].



Rycina 15.1: Możliwe postaci chimeryzmu poprzyszczepowego (przykładowe schematy obrazu elektroforetycznego). W przypadku chimeryzmu pełnego, obraz biorcy po przeszczepie jest identyczny jak obraz dawcy. W przypadku chimeryzmu mieszanego, pacjent po przeszczepie ma cechy zarówno dawcy jak i biorcy. Przy braku chimeryzmu po przeszczepie w elektroforezie obserwowane są jedynie piki charakterystyczne dla biorcy przed przeszczepem.

## 15.2. Oznaczanie chimeryzmu

Oznaczanie chimeryzmu pozwala stwierdzić i udokumentować przyjęcie się przeszczepionego materiału bądź jego odrzucenie. Badając chimeryzm poprzyszczepowy wielokrotnie po transplantacji można uchwycić ewentualne zmiany oraz monitorować ich dynamikę. Wysoka czułość tej metody umożliwia zdiagnozowanie wznowy choroby wcześniej niż inne metody.

Analiza chimeryzmu może również być pomocna w ocenie ryzyka wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft versus host disease*, GvHD). Szczególnie istotne jest tutaj przeprowadzenie badania w populacji limfocytów T. Pożądanym stanem pełnego chimeryzmu, w przypadku komórek T, jest związany z większym ryzykiem choroby GvH [3]. Mieszany chimeryzm świadczy o pewnej tolerancji immunologicznej pomiędzy komórkami dawcy i komórkami biorcy i jest związany z mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia GvHD. Brak reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi wiąże się jednak z brakiem reakcji przeszczep przeciwko białaczce (ang. *graft versus leukaemia*, GvL) co nie jest korzystne w przypadku pacjentów przeszczepionych z powodu choroby rozrostowej.

Badanie chimeryzmu poprzyszczepowego w populacji limfocytów B ma znaczenie u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną z komórek B. Pojawienie się mieszanego chimeryzmu może w tym przypadku świadczyć o możliwości wznowy choroby podstawowej.

Odrębną grupą chorych, są dzieci, u których dokonano zabiegu przeszczepienia komórek krwiotwórczych z powodu wrodzonego niedoboru odporności (ang. *severe combined immunodeficiencies*, SCID). Badanie chimeryzmu w subpopulacjach komórkowych (T, B, NK etc.) daje informacje o tym, czy uzupełniony został ubytek poszczególnych linii komórkowych.

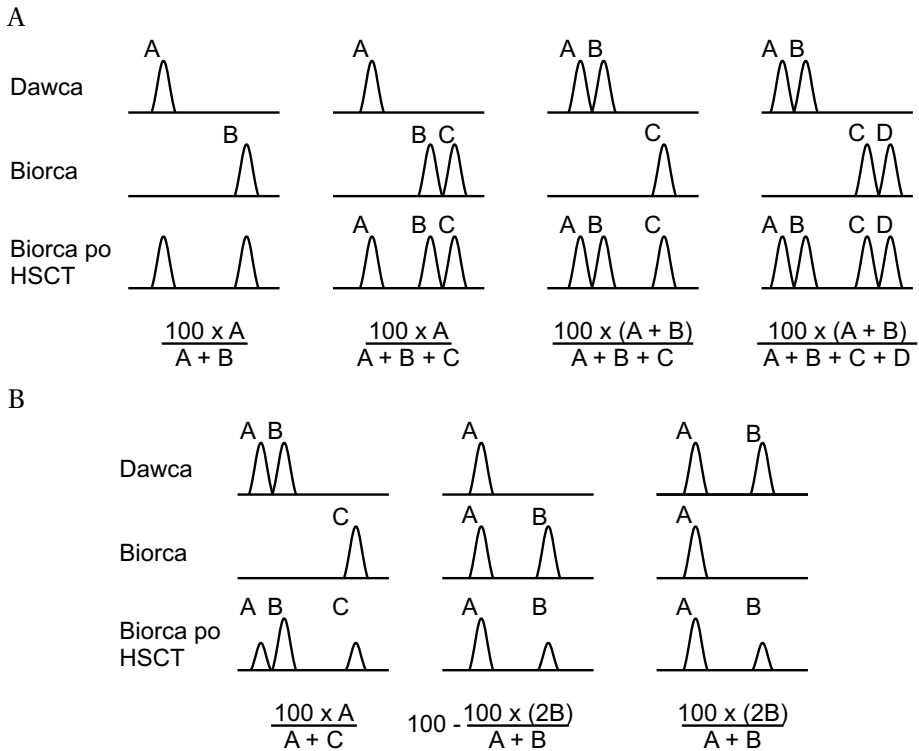
## 15.3. Metoda

Obecnie, do badania chimeryzmu poprzyszczepowego, najczęściej stosuje się metody biologii molekularnej. Dzięki pracy na materiale genetycznym, są one czulsze od stosowanych wcześniej, prowadzonych na poziomie komórkowym.

Metoda STR-PCR (ang. *short tandem repeat polymerase chain reaction*) jest najczęściej wykorzystywana. Opiera się na występującym w genomie polimorfizmie mikrosatelitarnym [4]. Miejsca polimorficzne charakteryzują się następującymi po sobie powtarzającymi się motywami zawierającymi od 1 do 6 par zasad, powtórzenia mogą znajdować się w części promotorowej genu, w intronach lub innych sekwencjach niepodlegających transkrypcji. Dzięki dużej zmienności jest to bardzo informatywna metoda, pozwala w niemal 100% par odróżnić dawcę i biorcę a dzięki temu monitorować pacjenta po przeszczepie. Dla każdej pary dawca – biorca należy ustalić, która para starterów będzie dawać produkt reakcji pozwalający odróżnić dawcę i biorcę (markery informatywne) i stosować je w dalszych analizach. Obecnie najczęściej używane są testy komercyjne zawierające zestaw starterów do przeprowadzenia reakcji multipleksowej. W każdej parze starterów zawsze jest jeden znakowany fluorochromem, którego świece-

15. STR i real-time PCR metody badania chimeryzmu poprzezzycznego

nie, w trakcie rozdzału elektroforetycznego następującego po reakcji PCR, wzbu-  
dzane jest przez wiązkę laserową. Jest to metoda póilościowa, pozwala ona na  
wylczenie procentowej zawartości komórek dawcy i biorcy w badanym materiale  
pobranym od pacjenta po przeszczepie. Aparatura, na której prowadzi się roz-  
dział elektroforetyczny produktów reakcji PCR (zwykle są to sekwenatory), wy-  
posażona jest w programy do analizy, podające wielkość pola powierzchni pod  
pikiem odpowiadającym produktowi reakcji. Pola powierzchni podstawiane są  
do odpowiednich wzorów, zależnych od układu pików. Inne wzory są dla par,  
u których dawca i biorca zupełnie różnią się układem pików (nie mają wspólnych  
alleli) (Rycina 15.2a), inne dla par z jednym allelem wspólnym (Rycina 15.2b).



Rycina 15.2: Wzory używane do obliczenia mieszanego chimeryzmu (odsetka komórek dawcy w badanej próbce): A - dla pary dawca-biorca z różnymi allelami; B - dla par z jednym wspólnym allelem.

Kolejne badania prowadzone po przeszczepieniu, z użyciem tych samych par starterów pozwalają na śledzenie zmian odsetka komórek dawcy i biorcy.

Analizę chimeryzmu można również prowadzić z użyciem metody Real-Time PCR. Pozwala ona w czasie rzeczywistym śledzić logarytmiczny przyrost produktu reakcji co jest proporcjonalne do początkowej ilości badanej matrycy DNA [5]. W tej metodzie najczęściej badany jest polimorfizm typu insercja/delecja. Zwykle stosuje się technologię TaqMan, w której poza parą starterów skierowa-

nych na miejsce polimorficzne w mieszaninie reakcyjnej jest również podwójnie znakowana sonda. Na końcu 5' znajduje się barwnik reporterowy natomiast na końcu 3' wygaszacz. W trakcie reakcji, sonda hybryduje z powielaną komplementarną sekwencją, następnie w czasie amplifikacji produktu, polimeraza Taq powoduje degradację sondy, wygaszacz oddziela się od barwnika reporterowego który emituje fluorescencje. Przyrost fluorescencji obserwuje w trakcie trwania reakcji. Jest to metoda, która pozwala otrzymać wynik szybciej niż w używając metody STR-PCR i charakteryzuje się większą czułością, jednak nieco większą trudność sprawia dobór markerów informatywnych dla danej pary dawca – biorca.

## 15.4. Podsumowanie

Oznaczanie chimeryzmu przeszczepowego to jeden z elementów diagnostyki prowadzonej u pacjentów po alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych. Jest to istotne oznaczenie przekładające się na sytuację kliniczną, którego wynik może być podstawą do dalszego leczenia. Mnogość dostępnych metod pozwala wybrać metodę optymalną, w zależności od posiadanych zasobów aparaturowych oraz kosztów analizy.

## Literatura

- [1] Dawidowska M., Wachowiak J.: Rozwój badań molekularnych w hematologii – monitorowanie minimalnej choroby resztkowej w ostrej białaczce limfo blastycznej i potransplantacyjnego chimeryzmu hematopoetycznego; *Now. Lek.*, 2007; 76: 282-291
- [2] Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T.: How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.*, 2005; 35: 107-119
- [3] Mattsson J., Uzunel M., Remberger M., Ringden O.: T-cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation; *Transplantation*, 2001; 71: 433-439
- [4] Thiede C., Florek M., Bornhauser M. i wsp.: Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection; *Bone Marrow Transplant.*, 1999; 23: 1055–1060
- [5] Alizadeh M., Bernard M., Danic B. i wsp.: Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction, *Blood*, 2002; 99: 4618-4625



# WSPÓŁCZESNE TECHNOLOGIE IDENTYFIKACJI DŁUGOŚCI TELOMERÓW

Barbara Wysoczańska

*Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu*

## Streszczenie

Telomery są elementami strukturalnymi usytuowanymi na końcach chromosomów. Zbudowane z powtarzających się sekwencji nukleotydów (TTAGGG)<sub>n</sub> wraz z białkami TBP (ang. *Telomere Binding Proteins, shelterin*) pełnią funkcje ochronne genomu. Współczesne technologie oparte na metodach biologii molekularnej umożliwiają określenie długości telomerów, aktywności telomerazy oraz prawidłowości ochronnej funkcji kompleksu białek shelterin. Do określenia długości telomerów dostępne są następujące techniki badawcze: Southern blots, TRF (ang. *Terminal Restriction Fragment*), QPCR (ang. *Quantitative Real Time PCR*), MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), STELA (ang. *Single Telomere Length Analysis*), Q-FISH (ang. *Quantitative fluorescence in situ hybridization*) oraz Flow-FISH (ang. *Flow cytometry FISH*). Wykorzystanie badań określających długość telomerów pozwala na dogłębne zrozumienie mechanizmów przedwczesnego starzenia komórkowego, etapu osiągania stanu spoczynkowego komórki, apoptozy oraz procesu nowotworzenia. Wykazana długość telomeru nie wpływa na rozpoznanie i prognozowanie, ale może być pomocna w zrozumieniu biologii komórki narażonej na stres środowiskowy oraz bodziec genotoksyczny.

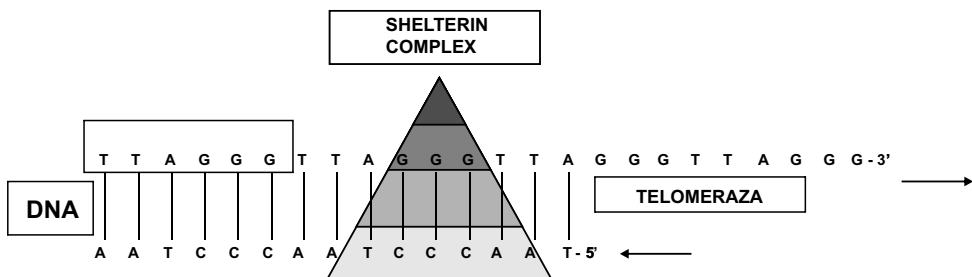
*Słowa kluczowe:* telomer, telomeraza, metody identyfikacji długości telomerów

## 16.1. Wstęp

Telomery to nukleoproteinowe elementy strukturalne chromosomów zbudowane z powtarzających się sekwencji (TTAGGG)<sub>n</sub> połączonych z białkami TBP (ang. *Telomere Binding Proteins*). Powtórzenia 6 nukleotydowe zawarte w 92 telomerach komórek diploidalnych mają wielkość od 500 do 2000 powtórzeń [1]. Liczba powtórzeń jest zmienna, ale co najmniej 100 powtórzeń stanowi wartość krytyczną dla ochrony chromosomu. Telomery zabezpieczają DNA przed rearanżacjami prowadzącymi do niestabilności genomu i nieprawidłowościami w kariotypie, chroniąc chromosomy przed zmianą struktury oraz fuzją. Struktury telomeryczne biorą udział w przestrzennej organizacji jądra komórkowego,

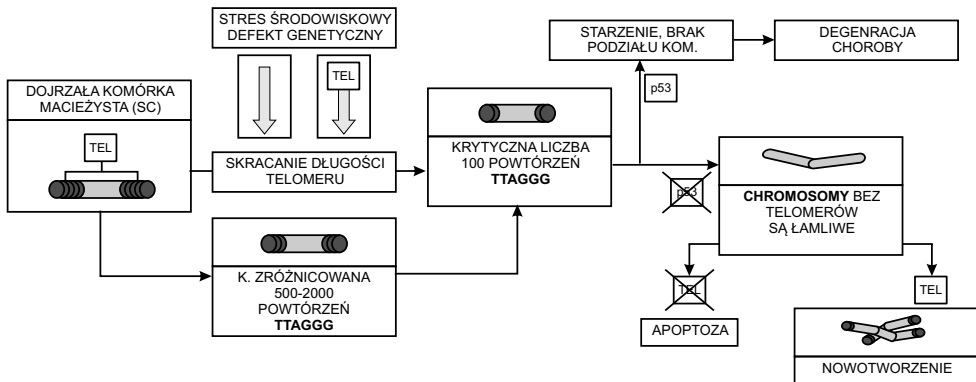
segregacji chromosomów podczas podziałów komórki oraz uczestniczą w regulacji transkrypcji genów zlokalizowanych w ich pobliżu. Chroniąc końce chromosomów przed działaniem nukleaz, telomery nie dopuszczają do uszkodzeń DNA i uruchomienia mechanizmów naprawczych [2]. Telomery są molekularnym zegarem, który informuje komórkę o przekroczeniu krytycznej liczby podziałów (50–70x, limit Hayflicka) [3]. Skrócenie telomerów poniżej wartości 100 powtórzeń uniemożliwia utrzymanie właściwej struktury przestrzennej telomerów. Zbyt krótkie telomery są sygnałem informującym o starzeniu się i mogą być rozpoznawane przez mechanizmy regulujące cykl komórkowy jako moment sygnalizujący konieczność wstrzymania dalszych podziałów. Długość telomerów stanowi wyznacznik łącznego ryzyka genetycznego i środowiskowego, który odzwierciedla określony styl życia [4]. Współczesne metody biologii molekularnej pozwalają na identyfikację długości telomerów, określenie aktywności telomerazy oraz na wykrycie zmian dotyczących struktury białek chroniących (ang. *shelterin*) [5]. Nie zdefiniowano dotychczas jaka długość telomerów jest normą, natomiast udokumentowano w jakich sytuacjach skracanie telomeru jest nieprawidłowością. Wiedza o biologii telomeru wymaga podjęcia decyzji dotyczących zmian stylu życia, bowiem długość telomerów jest krytycznym wyznacznikiem łącznego ryzyka genetycznego i środowiskowego (np. określonej diety, aktywności fizycznej, narażenie na stres, bodziec genotoksyczny). Schemat budowy telomeru przedstawiono na Rycinie 16.1.

Punktem wyjścia do nieodwracalnego zatrzymania podziałów komórkowych, świadczących o starzeniu komórkowym (ang. *senescence*), są trwałe nienaprawialne uszkodzenia DNA. Starzenie komórkowe występuje na skutek skracania telomerów, pozbawienia prawidłowej funkcji białek ochronnych np. w wyniku stresu oksydacyjnego, czy też genotoksycznego. Obecnie uważa się, że kompleks niekorzystnych zmian środowiskowych, związanych z metabolizmem mitochondriów oraz regulacja długości telomerów jest sygnałem do przedwczesnego starzenia się komórkowego [6]. Na Rycinie 16.2 przedstawiono schemat dynamiki procesu skracania się telomerów, który obserwuje się począwszy od stadium ko-



Rycina 16.1: Telomery zbudowane są z tandemowo powtórzonych sekwencji 6 nukleotydowych (TTAGGG)<sub>n</sub> połączonych z szeregiem wyspecjalizowanych białek (*shelterin*) warunkujących stabilność końca chromosomu. Struktura telomerów chroni genom przed uszkodzeniami oraz niekontrolowanym łączeniem się wolnych końców łańcuchów DNA. Telomeraza odpowiada za wydłużanie się telomerów.

## 16. Współczesne technologie identyfikacji długości telomerów



Rycina 16.2: Długość telomerów jest najwyższa w komórkach multipotencjalnych, kiedy obserwowana jest wysoka aktywność telomerazy (TEL). Podczas procesów życiowych komórki długość telomerów ulega sukcesywnemu skróceniu. W komórce zróżnicowanej obserwuje się ok. 500-2000 powtórzeń TTAGGG. Proces skracania się telomerów może być wzmocniony poprzez działanie bodźców środowiskowych, stresu oksydacyjnego, defektów genetycznych. Następuje starzenie komórkowe, ustają podziały, przyspieszony zostaje proces degeneracyjny, podatność na choroby wzrasta. Krytyczna liczba stu powtórzeń telomerycznych zwiększa podatność chromosomów do fuzji i ich łamliwości. Brak aktywności genów supresorowych np. p53 sprzyja genetycznym zmianom prowadząc do procesu nowotworzenia. Rycina zmodyfikowana wg [7].

mórki multipotencjalnej do stadium komórki spoczynkowej, apoptotycznej i nowotworowej.

### 16.2. Metody identyfikacji długości telomerów

Określenie długości telomerów jest pomocne w kontekście badań nad procesem starzenia się komórki, uwarunkowaniem rozwoju choroby i określeniem biomarkerów związanych z procesem nowotworzenia. W chwili obecnej istnieje wiele metod opartych na technologiach biologii molekularnej, które określają zmieniającą się w czasie długość telomerów. Wybór odpowiedniej techniki jest uwarunkowany liczebnością grupy badanej, dostępnością materiału biologicznego oraz wyborem stopnia precyzji pomiaru. W sytuacji, gdy setki/tysiące próbek wymagają testowania przeprowadza się zwykle reakcję QPCR, która jest jedyną metodą o wysokiej przepustowości i stanowi strategicznie dobrze dostępne narzędzie do wykorzystania. QPCR może być wykorzystany do badań epidemiologicznych, klinicznych oraz aplikacji przesiewowych. QPCR jest mniej dogodny dla badań złożonych z niewielkiej liczby próbek, pochodzących z bardzo unikatowej populacji, w której wymagany jest bardzo precyzyjny pomiar. Dla liczby 20-50 próbek może być wykorzystany Flow-FISH, ponieważ w tej złożonej z cytometrii i hybrydyzacji genetycznej metodzie można badać i analizować wiele typów unikatowych komórek jednocześnie, dotyczy to również wykorzystania metody TRF [8]. Metody Q-FISH i STELA znajdują zastosowanie do ba-

dania małych liczbowo próbek (około 5-10 i 1-5 próbek). Flow-FISH jest bardzo dokładną technologią przydatną w badaniach populacyjnych i badaniach o wydłużonym czasie obserwacji [9]. Ograniczenia co do wyboru metod występują odnośnie ilości i rodzaju materiału wyjściowego oraz czułości i rozdzielczości danej techniki [10]. Omówione poniżej wybrane technologie stanowią podstawę metodologiczną dla oznaczania długości telomerów w zróżnicowanych sytuacjach badawczych i klinicznych. Współczesne metody identyfikujące długość telomerów oparte są na technologii: Southern blots (podstawa TRF, ang. *Terminal restriction fragment*), PCR czasu rzeczywistego (QPCR), MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), STELA (ang. *Single TELOmere Length Analysis*), Q-FISH (ang. *Quantitative fluorescence in situ hybridization*) oraz Flow-FISH (ang. *Flow cytometry - FISH*). Metody te pozwalają na określenie długości telomerów na wysokim poziomie czułości i rozdzielczości. Charakterystykę wybranych metod podano w Tabeli 16.1.

Tabela 16.1: Porównanie wybranych parametrów charakteryzujących metody oznaczania długości telomerów. Tabela zmodyfikowana wg [10].

Metoda	Materiał wyjściowy		Rozdzielczość	
TRF	1-3×10 <sup>6</sup> kom	DNA 0,5-10ug	1kb	średnia długość telomerów w badanej populacji komórek
STELA	1×10 <sup>5</sup> kom	DNA (<100 pg)	0,1kb	metoda specyficzna dla pojedynczego chromosomu i krótkich telomerów
QPCR	20ng/reakcję	DNA	nd	(T)/(S) T liczba kopii telomer S liczba kopii standard
Q-FISH	10-20 metafaz <300 kom	DNA (<100 pg)	0,3kb	wolne końce chrom. fuzje chromosomów metafazy
FLOW-FISH	15-20 metafaz 0,5-3×10 <sup>6</sup> kom	świeżo izolowane WBC	0,2-0,3kb	barwienie - cytometr specyf. populacji kom.

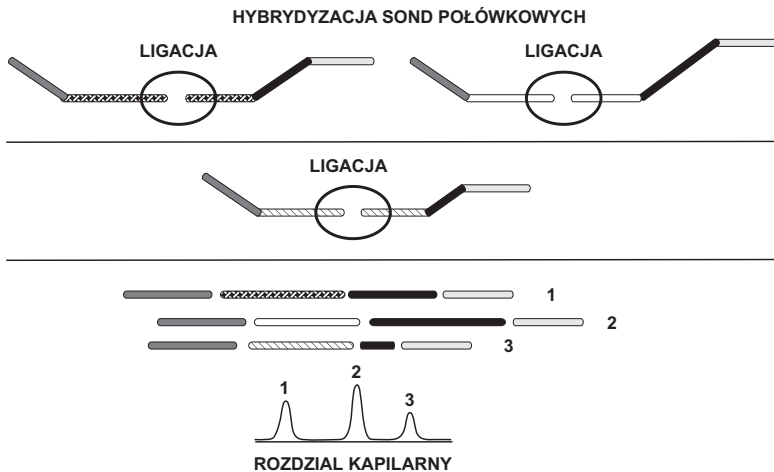
### 16.2.1. TRF (ang. *Terminal Restriction Fragment*)

Metoda TRF oparta jest na technologii Southern blots. Technika TRF wymaga 1-3×10<sup>6</sup> komórek (0,5-10 µg DNA), jej rozdzielczość wynosi 1 kb. Metoda nie znajduje zastosowania do analizy bardzo krótkich powtórzeń telomerowych. Metoda jest pomocna do walidacji i kalibrowania nowowprowadzonych metod dla określenia długości telomerów. Genomowe DNA wykorzystane w tej metodzie podlega cięciu przez enzymy restrykcyjne (*Hph1/Mnfl*, *Hinf1/Rsa1*), które trawią miejsca DNA bez powtórzeń telomerowych. Pozostałe fragmenty DNA uwidocz-

nione zostają w żelu agarozowym, przeniesione na membranę nylonową hybrydują ze znakowaną sondą specyficzną dla telomerów. Wywołanie produktów może również nastąpić dzięki wykorzystaniu komercyjnych zestawów chemiluminescencyjnych (TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche) [8].

### 16.2.2. MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Metoda identyfikuje mikrodelekcje i mikroduplikacje występujące w regionie subtelerowym, pozwalając określić długość telomerów za pomocą połączenia dwóch technologii PCR i ligacji sond. Konstrukcja sond używanych w tej metodzie opiera się na specyficznych wstawkach różnej długości, ligacja wzajemna sond stanowi podstawę do uzyskania pozytywnego wyniku w reakcji PCR (Rycina 16.3). Do reakcji wykorzystuje się ok. 200 – 400 ng genomowego DNA wysokiej jakości, zestaw specyficznych sond, ligazę oraz zestaw starterów znakowanych fluorescencyjnie (MLPA kit, MRC-Holland, <http://www.mrc-holland.com>). Odczyt i analiza reakcji MLPA przebiega z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej oraz programów specjalistycznych Genescan Analysis Software i Genotyper software (Applied Biosystems). Najnowsze prace badawcze i kliniczne opierają się na wykorzystaniu tego testu do analizy długości telomerów i zmian subtelerowych, popartych niejednokrotnie odrębnym testem np. FISH [11].

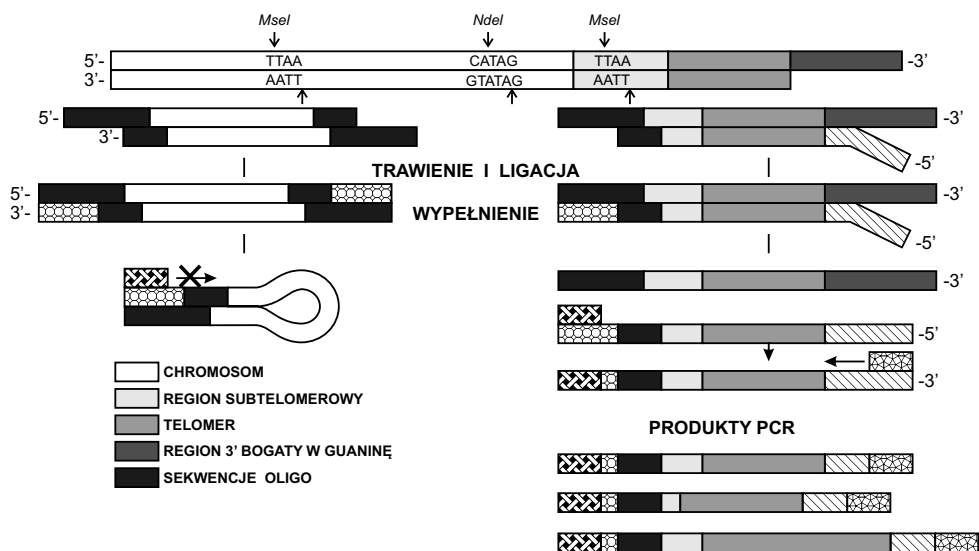


Rycina 16.3: Metoda MLPA opiera się na reakcji PCR (amplifikacja multipleks) zależnej od ligacji sond. MLPA polega na hybrydyzacji zestawu podwójnych sond z DNA, ligacji, a następnie amplifikacji badanych fragmentów, dzięki obecności uniwersalnych starterów [12].

### 16.3. STELA (ang. *Single TELomere Length Analysis*)

Znacząca utrata telomerowego DNA jest potencjalnie ważna w wywoływaniu starzenia komórkowego i zwiększenia częstości wystąpienia fuzji między chro-

mosomami. Obecnie tylko metoda STELA i Q-FISH mają zdolność wykrywania tych statystycznie istotnych odstępstw od średniej długości telomerów. Metoda ta wykorzystuje fakt, że wszystkie nici z końca jednego telomeru 3' są bogate w Guaninę, toteż ligacja oligonukleotydów specyficznych dla 5' końca telomeru przebiega za pomocą specyficznego szablonu. Starter specyficzny zawiera łącznik dla unikalnej sekwencji subtelerowej i generuje krótkie produkty dla indywidualnego ampliconu odzwierciedlającego pojedynczy telomer (Rycina 16.4). Głównym zastrzeżeniem do stosowania tej metody jest to, że nie wszystkie końce chromosomów mają odpowiednio dobraną sekwencję do projektowania unikalnych starterów dla ramion chromosomów, a więc technologia STELA jest zwykle ograniczona do kilku dobrze scharakteryzowanych końców chromosomalnych: XpYp, 2p, 11q, 12q i 17p [13]. Największą zaletą metody STELA jest zdolność do generowania bardzo dokładnych pomiarów długości telomerów z ograniczeniem ilości wyjściowego materiału DNA i liczby komórek (pg DNA, 50 komórek). Metodę wykorzystuje się do analizy rzadko występujących typów komórek. Podczas gdy miejsca restrykcyjne w analizie TRF są niezbyt precyzyjnie określone w regionie sub-telomerowym, to w metodzie STELA miejsce pomiaru jest znane i stabilne między poszczególnymi komórkami, długość telomerów jest mierzona precyzyjnie (0,1kb) [14, 15].



Rycina 16.4: Schemat przedstawiający kolejne etapy metody STELA, wg [14].

### 16.3.1. Q-PCR i MMQ-PCR (ang. *Monochrome Multiplex Quantitative Method in Real Time PCR*)

Obie te metody są szeroko stosowane w badaniach klinicznych i epidemiologicznych z uwagi na swą czułość, wysoką dostępność i przepustowość reak-

cji [16, 17]. Podczas amplifikacji w przebiegu reakcji PCR wykorzystuje się niedopasowanie długości końców telomerów bogatych zarówno w zasady C i G. Te dysproporcje w długości zmniejszają formowanie dimeru i adaptację w postaci wzmocnienia występującego tylko na telomerach w dwóch pierwszych cyklach PCR dla niskich temperatur. Pozostałe cykle PCR prowadzi się w wyższej temperaturze, wzmocnienie mierzy się ilościowo dla długości telomeru (T) w porównaniu do pojedynczego kopiowania genu (S). Wygenerowane proporcje T/S odzwierciedlają odpowiednie długości telomeru np. od 0.6 do 1.9 dla krwi pełnej u zdrowych, 0.99 u pacjentów z uszkodzonym szpikiem, 6.44 w komórkach policzka [17].

### 16.3.2. Q-FISH (ang. *Quantitative Fluorescence in situ Hybridization*)

Metoda wykorzystuje sondy specyficzne dla peptydu kwasu nukleinowego (PNA), o wysokim powinowactwie do DNA, bezpośrednio znakowane fluorescencyjnie dla chromosomów metafazalnych [18]. Fluorescencyjny sygnał może zostać wykrywany i mierzony względem znanych standardów chromosomu. Długość telomeru w metafazie oceniana jest z wykorzystaniem oprogramowania Q-FISH (analiza obrazu [www.flintbox.com](http://www.flintbox.com)). Q-FISH jest metodą pozwalającą na jednoczesne kariotypowanie. Do uzyskania wiarygodnego wyniku wymaga analizy 15-20 metafaz. Q-FISH jest również wykorzystywany do wykrywania końców chromosomów bez wykrywalnych powtórzeń (<0,5 kb), jak również do analizy fuzji chromosomów. Technika ta jest wykorzystywana do badania długości telomerów, w wielu sytuacjach klinicznych, w których mamy do czynienia z analizą komórek występujących rzadko. Q-FISH może sprawiać trudności przy identyfikacji typów komórek z bardzo niskimi wskaźnikami mitotycznymi [19].

### 16.3.3. Flow-FISH (ang. *Flow Fluorescence in situ Hybridization*)

Podobnie do Q-FISH, ta metoda wykorzystuje znakowane fluorescencyjnie sondy peptydowe (CCCTAA) 3 kwasu nukleinowego (PNA). W metodzie analizowane są komórki żywe z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej [20–22]. Flow-FISH można wykorzystać do pomiaru długości telomerów w mieszanych populacjach komórek, w pojedynczej próbce przez barwienie specyficznymi przeciwciałami lub najdogodniej w populacji komórek sortowanych. Wykorzystanie techniki Flow-FISH udokumentowano w badaniu pacjentów z anemią aplastyczną, u których zaobserwowano korelację pomiędzy długością telomerów w granulocytach a odpowiedzią na immunosupresyjne leczenie [23]. Wykazano również, że utrata telomerowych powtórzeń w komórkach hematopoetycznych dotyczyła pierwszego roku po alogenicznym przeszczepieniu szpiku [24]. Metodę Flow-FISH zastosowano jako metodę diagnostyczną do potwierdzenia klinicznego *dyskeratosis congenita*, choroby związanej ze zmianami genetycznymi w podjednostce telomerazy [20]. Określono też średnią długość telomerów w granulocytach, naiwnych komórkach T, komórkach T pamięci, oraz limfocytach B i NK w ludzkiej krwi [25].

## 16.4. Wykorzystanie metod określających długość telomerów

Badania długości telomerów, aktywności telomerazy oraz kompleksu białek ochronnych są szeroko omawiane w najnowszej literaturze naukowej [26–28]. Współczesne doniesienia literaturowe dotyczą badań nad zmienną długością telomerów a pomiarem aktywności telomerazy w kontekście zaobserwowanych mutacji i ich wpływu na rozwój chorób rozrostowych, w tym układu hematopoetycznego [29–31]. Szereg doniesień skupia swą uwagę nad badaniami osób w podeszłym wieku, korelując zaobserwowane zmiany długości telomerów ze znaczną podatnością na choroby neurodegeneracyjne [32–34]. W badaniach na grupie pacjentów z depresją potwierdzone zostały wcześniejsze doniesienia dotyczące wpływu na długość telomerów przewlekłych procesów zapalnych, związanych ze stresem oksydacyjnym komórki [35]. Starzenie komórkowe, chociaż z jednej strony stanowi barierę dla nowotworu, gdyż komórki które osiągnęły stan trwałego zatrzymania podziałów nie ulegną transformacji nowotworowej, to z drugiej strony może stymulować wzrost komórek przednowotworowych. Podczas starzenia komórka zmienia morfologię i funkcję, przechodzi nagle przeprogramowanie. Stare komórki zaczynają wydzielać do środowiska cytokiny prozapalne. Proces starzenia jest spowodowany uszkodzeniami wynikającymi z przypadkowych błędów w replikacji oraz działania reaktywnych form tlenu powstających w trakcie oddychania komórkowego. Styl życia (dieta, aktywność fizyczna), stres środowiskowy (infekcje) mają wpływ na długość telomerów [36,37]. Opisano wpływ skracania telomerów na powstawanie wielu chorób, w tym nowotworowych [38–41]. Nagroda Nobla przyznana w roku 2009 (którą otrzymali Elizabeth Blackburn, Carol Greider i Jack Szostak za opisanie telomerów u pierwotnika *Tetrahymena thermophila*, telomerazy oraz za wykazanie niestabilności liniowych cząsteczek DNA w komórkach, które nie mają na końcach telomerów) stała się wyjątkowo mobilizującym tematem dla współczesnych badań naukowych. Absolutnym tego dowodem jest parafraza myśli Thomas'a von Zglinicki: „*Will your telomeres tell your future? Not any time soon.*” [42].

### Literatura

- [1] Moyzis, R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., i wsp.: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1988; 85: 6622–6626
- [2] Murnane J.P.: Telomere dysfunction and chromosome instability. Mutation Research, 2012; 730: 28–36
- [3] Hayflick L.: Limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Experimental Cell Research, 1965; 37: 614–636
- [4] Lina J., Epel E., Blackburn E.: Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging. Mutation Research, 2012; 730: 85–89
- [5] de Lange T.: How telomeres solve the end-protection problem. Science, 2009; 326: 948–952



## 16. Współczesne technologie identyfikacji długości telomerów

- [6] Harbo M., Koelvræa S., Serakinci N., Bendix L.: Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress. *DNA Repair*, 2012; 11: 774–779
- [7] Einsele M.: All's well that ends well. *Nature*, 2011; 478: 13-15
- [8] Kimura M., Stone R.C., Hunt S.C. i wsp.: Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat. Protoc.*, 2010; 5: 1596–1607
- [9] Alter B.P., Baerlocher G.M., Savage S.A. i wsp.: Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*, 2007; 110: 1439–1447
- [10] Aubert G., Hills M., Lansdorp P.M.: Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research*, 2012; 730: 59–67
- [11] Monfort S., Orellana C., Oltra S., Rosello M., Guitart M., Martinez F.: Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J. Lab. Clin. Med.*, 2006; 147: 295–300
- [12] Koolen D. A., Nillesen W. M., Versteeg M. H. A. i wsp.: Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J. Med. Genet.*, 2004; 41: 892–899
- [13] Britt-Compton B., Rowson J., Locke M., Mackenzie I., Kipling D., Baird D.M.: Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 725–733
- [14] Bendix L., Horn P.B., Jensen U.B., Rubelj I., Kolvræa S.: The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell.*, 2010; 9: 383–397
- [15] Hills M., Lucke K., Chavez E.A., Eaves C.J., Lansdorp P. M.: Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA). *Blood*, 2009; 113: 5765- 5775
- [16] Cawthon R.M.: Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2002; 30: e47
- [17] Cawthon R.M.: Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: e21
- [18] Brind'Amour J, Lansdorp P.M.: Analysis of repetitive DNA in chromosomes by flow cytometry. *Nat. Methods.*, 2011; 8: 484-486
- [19] Aida J., Izumiyama-Shimomura N., Nakamura K. i wsp.: Basal cells have longest telomeres measured by tissue Q-FISH method in lingual epithelium. *Exp. Gerontol.*, 2008; 43: 833–839
- [20] Alter B.P., Baerlocher G.M., Savage S.A., i wsp.: Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*, 2007; 110: 1439–1447
- [21] Poon S.S., Lansdorp P.M.: Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. *Methods Cell Biol.*, 2001; 64: 69–96
- [22] Baerlocher G.M., Vulto I., de Jong G., Lansdorp P.M.: Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.*, 2006; 1: 2365–2376
- [23] Brummendorf T.H., Maciejewski J.P., Mak J., Young N.S., Lansdorp P.M.: Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*, 2001; 97: 895–900

#### 16.4. Wykorzystanie metod określających długość telomerów

- [24] Rufer N., Brummendorf T.H., Chapuis B., Helg C., Lansdorp P.M., Roosnek E.: Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. *Blood*, 2001; 97: 575–577
- [25] Baerlocher G.M., Lansdorp P.M.: Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry*, 2003; 55: 1–6
- [26] Weng N.: Telomeres and immune competency. *Current Opinion in Immunology*, 2012; 24: 470–475
- [27] Nordfjall K., Svenson U., Norrback K.F., Adolfsson R., Lenner P., Roos G.: The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent. *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000375
- [28] Gadalla S.M., Savage S. A.: Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood. Reviews.*, 2011; 25: 261–269
- [29] Hills M., Lansdorp P.M.: Short telomeres resulting from heritable mutations in the telomerase reverse transcriptase gene predispose for a variety of malignancies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009; 1176: 178–190
- [30] Peffault de Latour R., Calado R.T., Busson M., i wsp.: Age-adjusted recipient pre-transplant telomere length and treatment-related mortality after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2012; Epub ahead of print
- [31] Guardia R.D., Catalina P., Panero J., i wsp.: Expression Profile of Telomere-associated Genes in Multiple Myeloma. *J. Cell Mol. Med.*, 2012;
- [32] Collerton J., Martin-Ruiz C., Davies K., i wsp.: Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: cross-sectional findings from the Newcastle 85+. *Study. Mech. Ageing Dev.*, 2012; 133: 456-66
- [33] Guan J.Z., Guan W.P., Maeda T., Makino N.: The Subtelomere of Short Telomeres is Hypermethylated in Alzheimer's Disease. *Aging Dis.*, 2012; 3: 164-170
- [34] Armanias M., Blackburn E.H.: The telomere syndromes. *Nature ReviewGenetics*, 2012; 13: 693-704
- [35] Wolkowitz O.M., Mellon S.H., Epel E.S., i wsp.: Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress—preliminary findings. *PLoS ONE*, 2011; 6: e17837
- [36] Paul L.: Diet, nutrition and telomere length. *J. Nutr. Biochem.*, 2011; 22: 895- 901
- [37] van de Berg P.J., Griffiths S.J., Yong S.L., i wsp.: Cytomegalovirus infection reduces telomere length of the circulating T cell pool. *J. Immunol.*, 2010; 184: 3417–3423
- [38] Armanios M.: Syndromes of telomere shortening. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2009; 10: 45-61
- [39] Savage S.A., Bertuch A.A.: The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet. Med.*, 2010; 12: 753-764
- [40] Calado R.T., Young N.S.: Telomere diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 2353-2365
- [41] Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 2011; 20: 1238-1250
- [42] von Zglinicki T.: Will your telomeres tell your future? Not any time soon. *B.M.J.*, 2012; 344: e1727

# GENOTYPOWANIE POLIMORFIZMÓW POJEDYNCZEGO NUKLEOTYDU

Lidia Karabon

*Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu  
Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej, Akademia Medyczna  
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu*

## Streszczenie

W ostatnich latach obserwuje się znaczący rozwój technik opartych na zdobycach biologii molekularnej pozwalających na zbadanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu - SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*). Szczególnie rozwijane są techniki, które charakteryzują się wysoką czułością oznaczania i pozwalają na jednoczesne wykonanie oznaczeń dużej liczby prób przy stosunkowo niskim koszcie pojedynczego badania. Do takich technik należą min. genotypowanie przy użyciu sond fluorescencyjnych - np. metoda allelicznej dyskryminacji z wykorzystaniem sond TaqMan i aparatu *real-time* PCR, metody wykorzystujące minisekwencjonowanie (inaczej SNaPshot®, czyli wydłużanie startera) przy użyciu analizatorów genetycznych - sekwenatorów, a także techniki wykorzystujące cięcie enzymatyczne np. metoda Invader®. W niniejszym rozdziale zostaną opisane różne aspekty dotyczące powyższych metod: zasada, na jakiej oparte jest oznaczanie alleli, sposób detekcji oraz wady i zalety każdej z nich.

*Słowa kluczowe:* polimorfizm pojedynczego nukleotydu, metoda z zastosowaniem sond TaqMan, metoda SNaPshot®, metoda Biplex Invader®

### 17.1. Wstęp

W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęca się badaniu miejsc polimorficznych, szczególnie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Polimorfizmy te to najczęstsze dziedziczone zmiany w ludzkim genomie. Charakteryzują się wymianą pojedynczej zasady występującej z częstością powyżej 1% w przynajmniej jednej populacji. W ludzkim genomie występują z częstością 1 na ok. 2000 par zasad. Obejmują ok. 90% wszystkich różnic, jakie występują pomiędzy niespokrewnionymi osobami [1]. Uważa się, że indywidualny zestaw miejsc polimorficznych charakterystycznych dla danej osoby determinuje jej podatność na choroby min. nowotworowe, autoimmu-

nologiczne, infekcyjne [2], a w niektórych sytuacjach wystąpienie pojedynczego SNP determinuje pojawienie się choroby genetycznej (np. anemia sierpowata, hemofilia). Ponadto obecność polimorfizmów moduluje odpowiedź na leki lub czynniki środowiskowe np. chemiczne [3]. Rosnące zainteresowanie badaniami związku polimorfizmów z podatnością na choroby spowodowało znaczny rozwój metod służących do genotypowania i określania wariantów allelicznych określonych SNP. Jednak rozwój nowych technik nie byłby możliwy bez jednej z największych zdobyczy biologii molekularnej, jaką było wynalezienie przez Kary'ego Mullisa w 1983 roku metody powielania materiału genetycznego przy użyciu reakcji łańcuchowej polimeryzacji. Większość stosowanych obecnie metod genotypowania wymaga wcześniejszego namnożenia regionu DNA zawierającego interesujące nas miejsce polimorficzne.

Proces genotypowania, czyli określania obecności wariantów allelicznych badanego miejsca polimorficznego w danej próbce DNA, obejmuje następujące etapy: powielenie fragmentu zawierającego miejsce polimorficzne, oznaczenie zasady nukleotydowej znajdującej się w danym miejscu polimorficznym (oznaczenie allelu, ang. *allelic discrimination*) oraz detekcję sygnału pochodzącego od określonego nukleotydu. Do oznaczania obecności określonego nukleotydu stosuje się generalnie trzy techniki: przyłączanie (hybrydyzacja) sond specyficznych dla danego allelu (ang. *allele-specific oligonucleotide*, ASO), wydłużanie startera (ang. *primer extension*) i cięcie enzymem restrykcyjnym (ang. *allele specific enzymatic cleavage*, ASEC) [4]. Wszystkie te metody występują w różnych odmianach, a do każdej z nich stosuje się różne formy detekcji. W poniższym rozdziale zostaną opisane najnowocześniejsze metody pozwalające na szybkie i relatywnie tanie oznaczenie wariantów allelicznych w wielu próbkach równocześnie przy użyciu każdej z technik oznaczania alleli.

## 17.2. PCR-ASO - przyłączanie allelicznie specyficznych sond

PCR-ASO jest jedną z najprostszych metod oznaczania alleli w miejscu polimorficznym. Do zastosowania tej metody konieczne jest zaprojektowanie dwóch sond, z których każda przyłącza się tylko i wyłącznie do jednej formy allelicznej. Warunki hybrydyzacji sondy są ściśle dobrane, tak aby niesparowanie jednej zasady uniemożliwiało związanie sondy. Istnieje wiele wariantów tej metody.

W jednym z wariantów jedna z dwóch allelicznie specyficznych sond jest znakowana, druga natomiast nie. Reakcję hybrydyzacji przeprowadza się w dwóch osobnych naczyniach reakcyjnych: w jednym sonda pierwsza jest znakowana a druga nie, a w drugiej próbce pierwsza sonda jest bez znacznika natomiast druga sonda jest znakowana. Pojawienie się sygnału pochodzącego od znacznika świadczy o obecności specyficznego dla danej sondy allelu. Stosuje się wiele metod znakowania sond m.in. kolorymetryczne, immunofluorescencyjne, fluorescencyjne.

Odmiany metody PCR-ASO są często wykorzystywane przy typowaniu specyficzności HLA: na membranie, pasku, etc. naniesione są znakowane sondy dla

określonych specyficzności allelicznych i w odpowiednich warunkach temperatury i pH przeprowadza się hybrydyzację z powielonym badanym materiałem genetycznym. Jeżeli dany allel występuje w badanej próbce następuje przyłączenie się DNA do specyficznej znakowanej sondy i uwolnienie znacznika.

Odmianą tej metody jest również metoda PCR-SSP, w której zamiast sond dopasowanych do specyficznych alleli wykorzystuje się startery dopasowane do określonych form allelicznych. Reakcję przeprowadza się osobno dla każdego specyficznego startera (starter *revers* jest dla obu przypadków jednakowy). Jeżeli allel, do którego starter jest dopasowany występuje, wówczas następuje jego przyłączenie, zachodzi reakcja PCR i produkt jest namnażany. Jeżeli dany allel nie występuje reakcja PCR nie zachodzi. Metoda ta jest również szeroko stosowana w typowaniu HLA, gdyż pozwala oznaczyć wiele SNP w jednej próbce DNA.

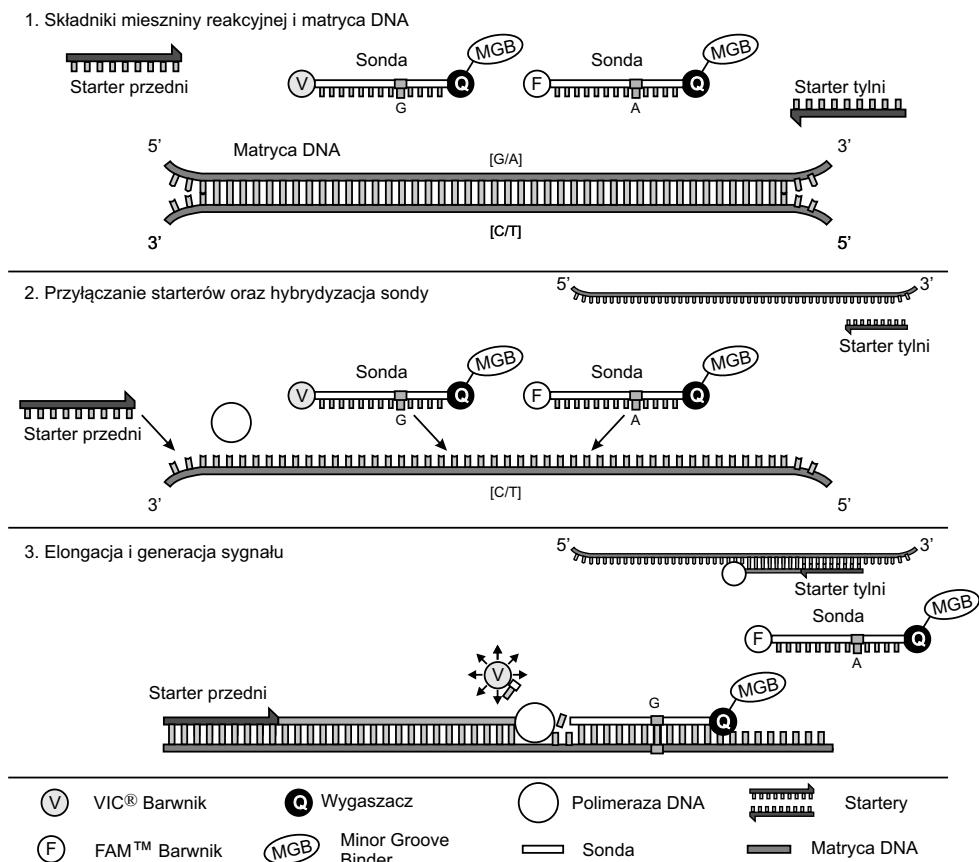
W badaniach wymagających określenia SNP w dużej liczbie próbek często wykorzystuje się metody, w których przeprowadza się hybrydyzację z dwiema sondami komplementarnymi do różnych alleli jednocześnie. Odmianą takiej metody jest oznaczanie alleli przy użyciu sond TaqMan przy wykorzystaniu aparatu do *real-time* PCR [5, 6].

Podobnie jak w przypadku PCR-ASO sondy są specyficzne dla każdego z alleli i znakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. W metodzie tej wykorzystywane jest zjawisko FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) tzn. wychwytywanie energii emitowanej przez jeden fluorochrom (*donor*) przez drugi blisko położony fluorochrom (*acceptor-quencher*). Sondy TaqMan są znakowane na 5' końcu dwoma różnymi barwnikami (donorami) dla dwóch różnych specyficzności allelicznych, natomiast na 3' końcu zawierają zazwyczaj wygaszacz wspólny dla obu donorów. Ponieważ w sondzie odległość pomiędzy donorem a wygaszaczem jest niewielka, energia emitowana przez donora jest pochłaniana przez wygaszacz. W trakcie reakcji PCR sonda przyłącza się komplementarnie do matrycy w miejscu polimorficznym. W czasie reakcji PCR wykorzystuje się 5'-egzonukleazową własność *Taq* polimerazy. Polimeraza dobudowując łańcuch do matrycy odcina nukleotydy sondy uwalniając znakowany nukleotyd. Gdy zwiększa się odległość donora od wygaszacza następuje emisja fluorescencji (Rycina 17.1).

Tak jak inne sondy, sonda TaqMan powinna charakteryzować się  $T_m$  około 70°C, znacząco wyższą od  $T_m$  starterów. Dzięki temu, podczas etapu przyłączania i wydłużania starterów, który przebiega w temp. 60°C, kompleks sonda-matryca pozostaje stabilny. W sytuacjach, w których projektuje się sondy dla sekwencji bogatych w pary AT uzyskanie  $T_m$  dupleksu sonda-matryca zbliżonej do 70°C jest trudne bądź niemożliwe. Jeżeli  $T_m$  dupleksu jest zbyt niska, sonda nie wiąże się stabilnie z matrycą, i w takiej sytuacji polimeraza Taq zamiast trwać koniec 5' sondy, powoduje jej odłączenie od nici matrycowej (tzw. „zrzucanie sondy”). Aby zwiększyć temperaturę topnienia sondy do jej 3' końca przyłącza się cząsteczkę wiążącą się do mniejszej bruzdy podwójnej helisy tworzonej przez kompleks sondy i matrycy - MGB (ang. *minor groove binder*) [7].

Przy genotypowaniu z użyciem sond TaqMan przeprowadza się wstępny etap odczytu fluorescencji z płytki przed reakcją PCR (pomiar tła), następnie prze-

## 17.2. PCR-ASO - przyłączenie allelicznie specyficznych sond

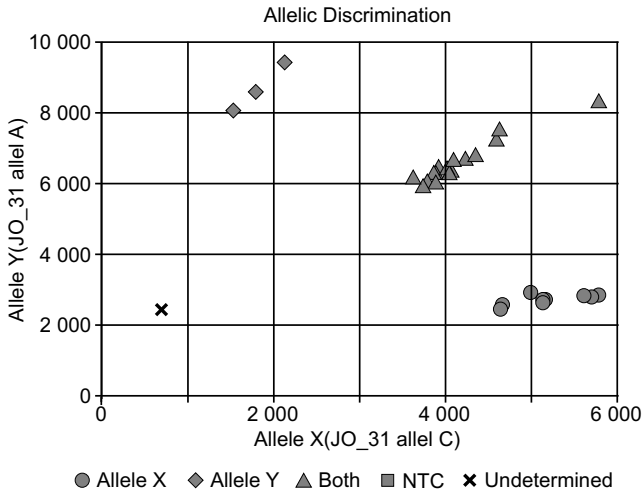


Rycina 17.1: Schemat reakcji genotypowania przy użyciu sond TaqMan. W mieszaninie reakcyjnej znajdują się startery oraz dwie sondy znakowane na 5' końcu dwoma różnymi barwnikami oraz posiadające na 3' końcu cząsteczkę MGB, która jest wygaszaczem. Każda z sond jest specyficzna do jednego z alleli występujących w danym SNP. Ze względu na bliską odległość pomiędzy znacznikiem fluorescencyjnym (zazwyczaj VIC lub FAM) a cząsteczką MGB, fluorescencja znacznika jest pochłaniana i sonda nie świeci. W czasie reakcji PCR sonda wiąże się komplementarnie do odpowiedniego allelu. Podczas etapu wydłużania startera (elongacji), polimeraza *Taq* (ze względu na swoją aktywność egzonukleazową) w momencie napotkania przyłączonej sondy, odcina po kolei związane nukleotydy. Powoduje to oderwanie się znakowanej na 5' końcu zasady, zwiększenie odległości od wygaszacza, a w konsekwencji świecenie barwnika fluorescencyjnego. W reakcji genotypowania przeprowadza się odczyt fluorescencji przed reakcją PCR w celu pomiaru tła oraz drugi odczyt po reakcji PCR, w której bada się fluorescencję VIC i FAM. W przypadku osobników homozygotycznych pojawia się fluorescencja tylko od jednego barwnika, a w przypadku heterozygot od dwóch barwników [8].

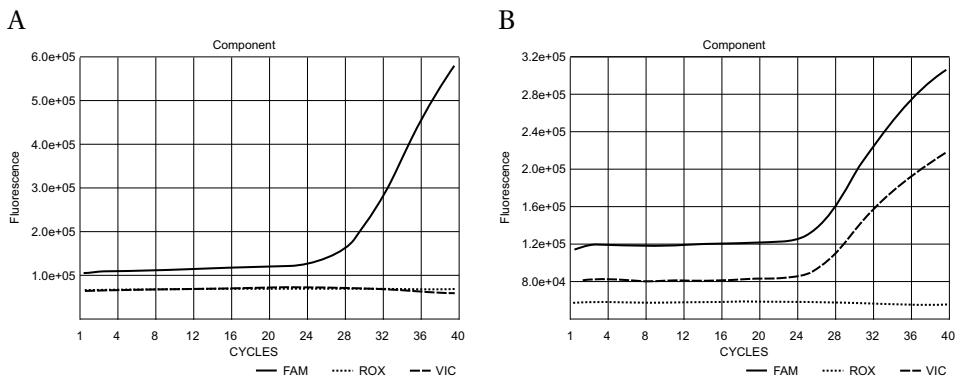
## 17. Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu

proceedza się reakcję PCR, a po jej zakończeniu po raz kolejny następuje pomiar uwolnionej fluorescencji (Ryciny 17.1, 17.2, 17.3).

Zastosowanie sond TaqMan w oparciu o gotowe zestawy odczynników (np. firmy Life Technologies) nie wymaga optymalizacji i walidacji. Jest to metoda szybka, mało pracochłonna, czuła (wymagająca niewielkiej ilości DNA - ok. 15 ng na próbkę) i dostarczająca wiarygodnych wyników. Wyniki niejednoznaczne zdarzają się niezwykle rzadko.



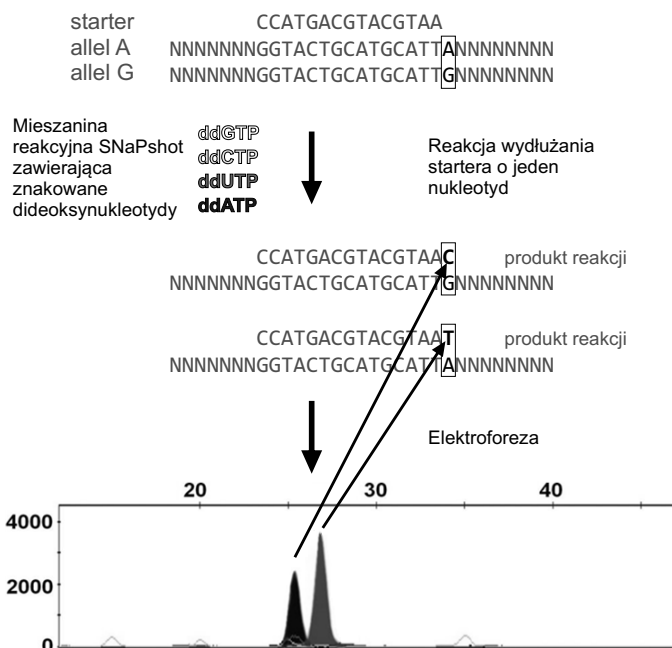
Rycina 17.2: Odczyt po reakcji post-PCR - w zakładce „Results”. Romby obrazują fluorescencję fluorochromu VIC, którym w przedstawionym na rysunku badaniu znakowany był allel A, kółka obrazują fluorescencję barwnika FAM, którym znakowany był allel C, natomiast trójkąty przedstawiają fluorescencję obu znaczników i świadczą o obecności heterozygot.



Rycina 17.3: Przykładowy obraz fluorescencji A) FAM, homozygota CC, B) VIC i FAM, heterozygota AC.

### 17.3. Reakcja wydłużania startera o jeden nukleotyd znakowany fluorescencyjnie SNaPshot® (ang. *primer extension reaction*)

Metoda SNaPshot®, zwana także minisekwencjonowaniem wymaga przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimeryzacji w celu amplifikacji interesującego nas fragmentu DNA. Uzyskane produkty poddaje się oczyszczeniu, aby pozbyć się nadmiaru starterów, wolnych nukleotydów i resztek enzymu - polimerazy *Taq*. W kolejnym etapie przeprowadza się reakcję tzw. „snapowania”, w której używa się starterów, przyłączających się w miejscu oddalonym o jeden nukleotyd powyżej badanego SNP. W trakcie reakcji dobudowywany jest tylko jeden dideoksynukleotyd komplementarny do oznaczanej zasady. Każdy dideoksynukleotyd jest znakowany innym barwnikiem fluorescencyjnym, ddATP - barwnikiem zielonym (dR6G), ddCTP - czarnym (dTAMRA™), ddGTP - niebieskim (dR110), ddUTP - czerwonym (ROXTM). Przyłączenie dideoksynukleotydu powoduje przerwanie procesu wydłużania łańcucha, gdyż analog nie zawiera grupy 3'-OH, która jest potrzebna do utworzenia wiązania fosfodiesterowego [9] (Rycina 17.4). Otrzymany produkt PCR poddaje się analizie elektroforyzacji w analizatorze ABI PRISM®



Rycina 17.4: Schemat reakcji snapowania. Starter kończy się tuż przed SNP. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi znakowane dideoksynukleotydy. Otrzymany produkt jest o jeden nukleotyd dłuższy od startera i na 3' końcu posiada znacznik fluorescencyjny. Po reakcji przeprowadza się elektroforezę w analizatorze ABI PRISM® Genetic Analyzer (PE Biosystems). Zmodyfikowano wg [10].

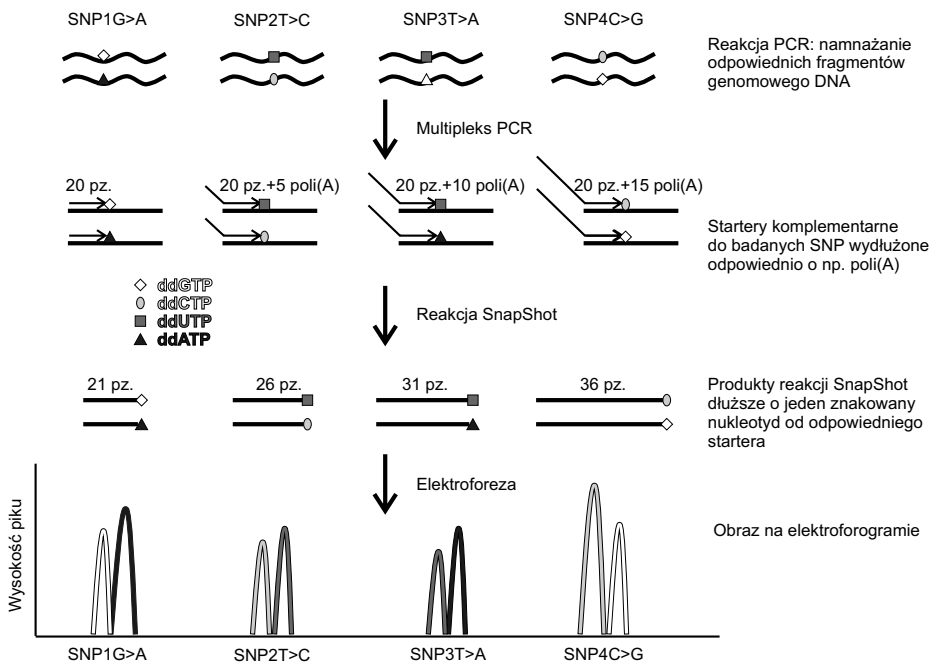


17. Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu

Genetic Analyzer (PE Biosystems). Dostępny jest również zestaw zawierający wszystkie potrzebne odczynniki do przeprowadzenia reakcji: The SNaPshot™ ddNTP Primer Extension Kit (Applied Biosystems).

Zaletą tej metody jest możliwość jednoczesnego genotypowania kilku miejsc polimorficznych równocześnie w tak zwanym multipleksie. Przy zastosowaniu tej techniki możliwe jest typowanie aż do dziesięciu SNP w jednej reakcji, niezależnie od ich położenia na chromosomie i odległości pomiędzy nimi. Ponieważ stosuje się nieznakowane startery koszt typowania w multipleksie jest relatywnie niski.

Dla reakcji snapowania w multipleksie projektuje się startery dla każdego z badanych miejsc, tak aby różniły się długością co najmniej o 4-6 nukleotydów. Zazwyczaj standardowe startery modyfikuje się przez dodanie na 5' końcu niekomplementarnego łańcucha polinukleotydów np. poli(dA), poli(dC), i poli(dGACT). Poli(dT) jest rzadziej stosowany ze względu na możliwość przyłączania się do łańcucha poli(A) w regionie 3' genu. Schemat reakcji SNaPshot®, w multipleksie przedstawiono na Rycinie 17.5.



Rycina 17.5: Schemat genotypowania czterech SNP przy użyciu metody multipleksu. Do reakcji snapowania projektuje się startery analogicznie jak dla pojedynczego badania, które dodatkowo wydłuża się na 5' końcu o niekomplementarne ogony polinukleotydowe o różnej długości, w tym przykładzie 5,10,15 poli(A). W wyniku reakcji otrzymuje się produkty odpowiednio o długości 21, 26, 31, 36 par zasad. Na elektroforogramie obserwuje się rozdzielone różnobarwne piki odpowiadające nukleotydów dla poszczególnych SNP (zmodyfikowano na podstawie [11]).

## 17.4. Cięcie enzymatyczne - metoda Invader®

Najstarszą i najczęściej używaną metodą genotypowania jest cięcie enzymem restrykcyjnym (ang. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Oznaczenie występowania poszczególnych alleli w danym miejscu polimorficznym opiera się na wykorzystaniu własności enzymów restrykcyjnych do egzonukleazowego cięcia unikalnych sekwencji DNA rozpoznawanych przez dany enzym restrykcyjny. Metodę tę stosuje się tylko wówczas, gdy istnieje enzym rozpoznający sekwencję wokół badanego SNP, który przecina sekwencję w obecności jednego allelu i zachowuje ją w obecności drugiego. Otrzymane po trawieniu enzymem fragmenty są separowane na żelu agarozowym. Na podstawie analizy długości fragmentów określa się, czy zaszło trawienie enzymem, co oznacza, że wystąpił jeden z alleli, czy też nie nastąpiło cięcie, co świadczy o obecności drugiego allelu.

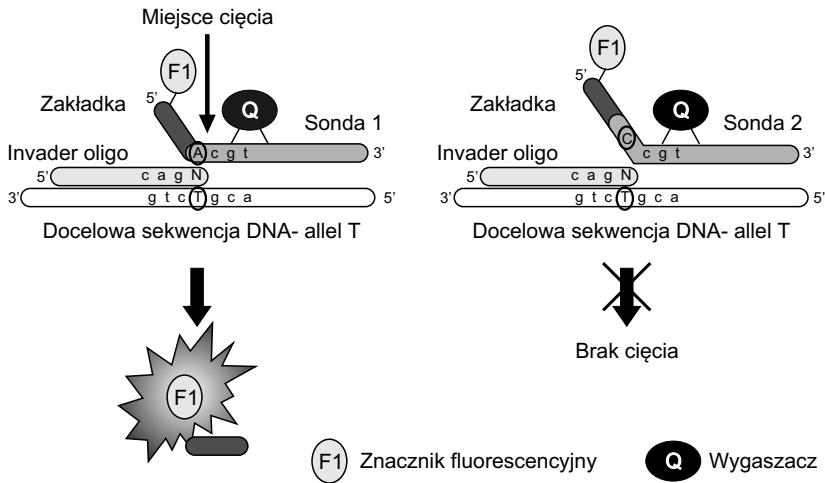
Zastosowanie tej metody jest ograniczone tylko do tych miejsc polimorficznych, dla których można znaleźć odpowiednie enzymy restrykcyjne. Ponadto jest to metoda dosyć pracochłonna i nie nadaje się do badań na dużą skalę.

Rozwiązaniem wykorzystującym cięcie enzymatyczne, ale pozbawionym ograniczeń metody RFLP jest metoda Invader®. W teście Invader® zastosowano sondy nakładające się na miejsce polimorficzne i enzym, który specyficznie rozpoznaje powstającą „zakładkę” [12].

W metodzie tej używa się dwóch oligonukleotydów, które hybrydują do danego regionu zawierającego SNP. Jeden oligonukleotyd (oligo Invader®) jest komplementarny do sekwencji 3' regionu obejmującego SNP i kończy się zasadą nie pasującą (nie komplementarną) do SNP nakładającą się na tę zasadę. Drugi oligonukleotyd, sonda specyficzna dla danego allelu, która z jednej strony jest komplementarna do 5' regionu SNP, natomiast z drugiej wydłużona niekomplementarnie o kilka zasad. Przyłączenie się obu oligonukleotydów do badanej sekwencji DNA powoduje utworzenie trójwymiarowej struktury przestrzennej nad badanym SNP rozpoznawanej i przecinanej przez enzym FEN (ang. *flap endonuclease*) [13]. W celu detekcji określonych alleli stosuje się opisaną w poprzednim rozdziale technikę FRET, tzn. na 5' końcu sonda zawiera fluorochrom, a na 3' końcu wygaszacz. Po odcięciu 5' końca sondy przez enzym FEN, uwolniony fragment zawierający fluorochrom oddala się od wygaszacza i zaczyna świecić. Jeżeli sonda „nie pasuje” do danego allelu nie tworzy się przestrzenna struktura rozpoznawana przez FEN i reakcja nie zachodzi (Rycina 17.6). Ta metoda jest wysoce specyficzna i przy nie dopasowanej sondzie nie zachodzi nawet minimalne cięcie.

Zazwyczaj oligo Invader® jest tak zaprojektowany, żeby był na stałe przyłączony do badanego regionu DNA, natomiast sonda ma temperaturę topnienia zgodną z temperaturą, w jakiej przeprowadza się test, co sprawia, że sonda przyłącza się i odłącza. W czasie przyłączenia enzym przecina oligonukleotyd, pozostały fragment sondy odrywa się, a kolejna sonda może się przyłączyć do badanego miejsca. Metoda zapewnia wysoką specyficzność genotypowania, ale wymaga wstępnego powielenia badanego fragmentu DNA, a ponadto konieczne jest

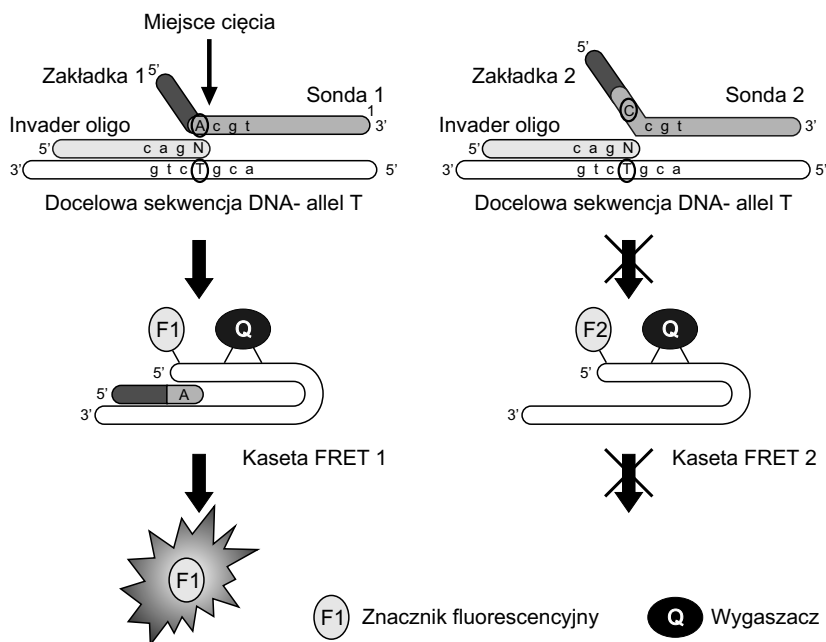
## 17. Genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu



Rycina 17.6: Metoda Invader®. Oligo Invader (komplementarny do sekwencji 3' regionu obejmującego SNP i kończy się zasadą nie pasującą i nakładającą się na tę zasadę) przyłącza się do sekwencji docelowej. Sonda specyficzna dla danego allelu, z jednej strony jest komplementarna do 5' regionu SNP, ale z drugiej strony jest wydłużona niekomplementarnie o kilka zasad. Przyłączenie się sondy i oligo Invader do badanej sekwencji DNA powoduje utworzenie trójwymiarowej struktury przestrzennej nad badanym SNP rozpoznawanej i przecinanej przez enzym FEN. W celu detekcji określonych alleli stosuje się technikę FRET: na 5' końcu sonda zawiera fluorochrom, a na 3' końcu wygaszacz. Po odcięciu 5' końca sondy przez enzym FEN, uwolniony fragment zawierający fluorochrom oddala się od wygaszacza i zaczyna świecić. Jeżeli sonda „nie pasuje” do danego allelu nie tworzy się przestrzenna struktura rozpoznawana przez FEN i reakcja nie zachodzi (modyfikowane wg [12]).

zastosowanie dwóch znakowanych sond, specyficznych do każdego z alleli, co zwiększa koszty typowania.

Hall i wsp. [14] starając się zredukować ograniczenia tej metody zastosowali szereg modyfikacji, co doprowadziło do wynalezienia metody Bplex Invader®, inaczej nazywaną SISAR (ang. *seria invasive signal amplification reaction*). Metoda Bplex Invader® oparta jest na dwuetapowym teście. W pierwszym etapie, podobnie jak w opisanej powyżej reakcji Invader®, dwa oligonukleotydy komplementarne do docelowej sekwencji przyłączają się do regionu obejmującego badane SNP. Jednakże, inaczej niż poprzednio, sondy nie są znakowane fluorescencyjnie, natomiast ich 5' końce są dodatkowo wydłużone o niekomplementarny do sekwencji fragment. Te fragmenty sond nazywane „zakładką” (flap), są inne dla każdej z dwóch sond, i nie przyłączają się do badanego DNA. Jeżeli sonda pasuje do danego allelu, to po przyłączeniu się oligo Invader® i sondy, powstaje przestrzenna trójwymiarowa struktura rozpoznawana przez enzym FEN i „zakładka” powiększona o nukleotyd komplementarny do allelu znajdującego się w badanym miejscu polimorficznym jest odcinana. Ponieważ „zakładki” są niezależne od badanego regionu, w następnym etapie testu używa się dwóch



Rycina 17.7: Metoda Bipllex Invader®. W pierwszym etapie oligo Invader i sonda przyłączają się do regionu 5' Koniec sondy jest wydłużony i nie jest komplementarny do sekwencji, nie przyłącza się do badanego DNA tylko tworzy „zakładkę” (flap). „Zakładka” dla każdej z dwóch sond jest inna. Jeżeli sonda pasuje do danego allelu, to po przyłączeniu oligo Invader® i sondy następuje cięcie, „Zakładka” powiększona o nukleotyd komplementarny do allelu SNP jest odcinana. W następnym etapie używa się dwóch „kaset FRET”, każdej pasującej do 3' końca innej zakładki. Kaseta FRET zawiera również odpowiedni fluorochrom oraz wygaszacz na 5' końcu. Po przyłączeniu „zakładki” do kasety FRET powstaje miejsce cięcia enzymem FEN. Trawienie oddala fluorochrom od wygaszacza i emitowana jest właściwa fluorescencja (zmodyfikowane wg [12]).

„kaset FRET”, każdej pasującej do innej „zakładki”. Kaseta FRET zawiera na 3' końcu sekwencję pasującą do danej „zakładki”, a odpowiedni fluorochrom oraz wygaszacz na 5' końcu. Po związaniu się „zakładki” z kasetą FRET powstaje znów struktura przestrzenna rozpoznawana przez enzym FEN, przy czym miejsce cięcia znajduje się przed wygaszaczem. Trawienie enzymem oddala fluorochrom od wygaszacza i emitowana jest fluorescencja (Rycina 17.7).

Otrzymany z czynnika fluorescencji wynik jest analogiczny do obrazu wyników otrzymywanych w metodzie z zastosowaniem sond TaqMan (Rycina 17.1).

Ta technika ma szereg zalet w stosunku do poprzedniej. Test jest wielokrotnie bardziej czuły i pozwala na genotypowanie bez konieczności wcześniejszej amplifikacji DNA. Sondy nie są znakowane fluorescencyjnie, co powoduje obniżenie kosztów. Dodatkowo używane w tej metodzie „zakładki” są uniwersalne i pasują do odpowiednich komercyjnych kaset FRET. Zastosowanie kaset FRET jest mniej kosztowne, ponieważ ze względu na swoją uniwersalność mogą być produkowane na szeroką skalę.

## 17.5. Podsumowanie

Każda z opisanych powyżej metod może być stosowana do oznaczania wielu próbek jednocześnie tzn. na 96-dołkowej płytce. Wszystkie metody mają podobną powtarzalność, zbliżony odsetek błędów i niejednoznacznych wyników [15]. Natomiast każda z nich ma określone zalety i ograniczenia.

**Metoda z zastosowaniem sond TaqMan** jest prosta i szybka - ok. 2 h, (przygotowanie reakcji PCR na 96 próbek trwa ok. 0.5 h, reakcja PCR ok. 1,5 h, odczyt fluorescencji przed i po reakcji ok. 5 minut). Metoda jest czuła i nie wymaga wysokich stężeń DNA (15 ng DNA na reakcję), a ponadto charakteryzuje się stosunkowo małą liczbą wyników niejednoznacznych. Do zalet należy również zaliczyć stale rosnącą liczbę komercyjnie dostępnych, zwalidowanych i zoptymalizowanych testów np. firmy Life Technologies. Mankamentem jest stosunkowo wysoka cena za jedno oznaczenie i konieczność posiadania aparatu do *real-time* PCR.

Największą zaletą **metody SNaPshot®** jest możliwość oznaczania od kilku nawet do dziesięciu SNP równocześnie. Takie podejście wymaga jednak pracochłonnej optymalizacji, którą badacz musi wykonać przed przeprowadzeniem testu. Sama procedura jest ponadto wieloetapowa i czasochłonna. Metoda wymaga wcześniejszej amplifikacji badanego fragmentu (ok. 2 h), oczyszczenia produktów po pierwszym PCR przy użyciu enzymów Exo -SAP - (ok 1 h), następnie przeprowadzenia reakcji snapowania (ok. 2 h z przygotowaniem reakcji), kolejnego oczyszczania po drugim PCR (1 h), a następnie elektroforezy kapilarnej w analizatorze genetycznym - ok. 6 h. Dodatkowym utrudnieniem jest konieczność posiadania drogiego wyposażenia, jakim jest sekwenator ABI PRISM®, Genetic Analyzer (PE Biosystems).

Niewątpliwą zaletę metody Biplax Invader® stanowi brak etapu powielania materiału do badań. Równie korzystna jest stosunkowo niska cena jednego oznaczenia. Dodatkowym atutem jest możliwość przeprowadzenia typowania bez konieczności użycia specjalistycznego sprzętu - do odczytu konieczny jest jedynie czytnik fluorescencji. W artykule Pati i wsp. [15] stwierdzono, że wśród trzech porównywanych metod: SNaPshot®, Pyrosequencing® i Biplax Invader®, ta ostatnia charakteryzowała się największą dokładnością i najniższym kosztem pojedynczego genotypowania. Niestety w Polsce jest to mało popularna metoda, co wynika prawdopodobnie z braku na krajowym rynku przedstawiciela firmy Third Wave Technologies będącej właścicielem patentu na tę metodę.

## Literatura

- [1] Risch N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium, *Nature*, 2000 15; 405(6788): 847-56
- [2] Taylor J.G., Choi E.H., Foster C.B., Chanock S.J. Using genetic variation to study human disease, *Trends Mol Med*. 2001; 7(11): 507-12
- [3] Gray I.C., Campbell D.A., Spurr N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(16):2403-8
- [4] Twyman R.M., Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping Techniques- an overview, *Encyclopedia of Diagnostics of Genomics and Proteomics*, 2005 by Marcell

- Dekker, 1202-1207
- [5] Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3761-3766
  - [6] Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Meth Appl* 1995; 4: 357-362
  - [7] Afonina I.A., Reed M.W., Lusby E., Shishkina I.G., Belousov Y.S. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques* 2002; 32: 940-9
  - [8] Product bulletin, TaqMan® SNP Genotyping Assays, Life Technologies
  - [9] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7
  - [10] Product bulletin, SNaPshot® SNP Analysis SNaPshot® Multiplex System for SNP genotyping, One system, many applications, Applied Biosystems by Life Technologist
  - [11] Product bulletin, SNaPshot® Multiplex System, Applied Biosystems by Life Technologist
  - [12] Olivier M. The Invader® assay for SNP genotyping. *Mutat Res.* 2005,3;573: 103-10
  - [13] Lyamichev V., Mast A.L., Hall J.G., Prudent J.R., Kaiser M.W., Takova T., Kwiatkowski R.W., Sander T.J., de Arruda M., Arco D.A., Neri B.P., Brow M.A. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes, *Nat Biotechnol.* 1999;17(3): 292-6
  - [14] Hall J.G., Eis P.S., Law S.M., Reynaldo L.P., Prudent J.R., Marshall D.J., Allawi H.T., Mast A.L., Dahlberg J.E., Kwiatkowski R.W., de Arruda M., Neri B.P., Lyamichev V.I. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15): 8272-7
  - [15] Pati N., Schowinsky V., Kokanovic O., Magnuson V., Ghosh S. A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and bplex Invader® SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J Biochem Biophys Methods.* 2004 30;60(1): 1-12

# DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA NIEPOŻĄDANYCH POPRZETOCZENIOWYCH REAKCJI IMMUNOLOGICZNYCH

Jolanta Korsak

*Zakład Transfuzjologii Klinicznej, Wojskowego Instytutu Medycznego,  
Warszawa*

## Streszczenie

Niepożądane reakcje poprzetoczeniowe stanowią różnorodną grupę chorób lub objawów będących skutkiem przetoczenia krwi lub jej składników, które zwykle pojawiają się w trakcie przetoczenia, lub w krótkim czasie po jego zakończeniu. Różnorodność reakcji poprzetoczeniowych oznacza, że nie istnieje jeden algorytm postępowania, który określałby sposób diagnostyki laboratoryjnej i leczenia wszystkich reakcji poprzetoczeniowych. Diagnostyka musi być podyktowana obrazem klinicznym, szczególnie w nietypowych przypadkach. W piśmiennictwie można spotkać kilka różnych podziałów reakcji poprzetoczeniowych. Uwzględniają one czas, w jakim pojawiają się objawy (wczesne, późne), możliwość występowania niszczenia krwinek czerwonych (hemolityczne i niehemolityczne) oraz mechanizm, w jakim występują (immunologiczne i nieimmunologiczne). W rozdziale przedstawiono immunologiczne reakcje poprzetoczeniowe, których ryzyko wystąpienia związane jest z przetoczeniem krwi lub jej składników. Omówiono również aspekty laboratoryjne i możliwości diagnostyczne tych reakcji.

*Słowa kluczowe:* składniki krwi, immunologiczne reakcje poprzetoczeniowe, badania laboratoryjne

## 18.1. Wstęp

Ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji po przetoczeniu składników krwi jest trudne do ustalenia, ponieważ zależy ono od wielu czynników, takich jak: rodzaj przetaczanego składnika, jego objętości i szybkości przetaczania, pory dnia dokonywanego przetoczenia oraz stanu zdrowia biorcy.

Poprzetoczeniowe reakcje immunologiczne możemy podzielić ze względu na kryterium czasu w jakim pojawiają się objawy. Rozróżniamy reakcje poprzetoczeniowe wczesne, pojawiające się w czasie przetoczenia lub w ciągu 24 godzin po przetoczeniu oraz niepożądane poprzetoczeniowe reakcje późne, których objawy

występują po upływie 24 godzin od zakończenia przetoczenia. Innym podziałem jest możliwość występowania hemolizy – niehemolityczne niepożądane reakcje poprzetoczeniowe i hemolityczne niepożądane reakcje poprzetoczeniowe [1]. W Tabeli 18.1 przedstawiono klasyfikację immunologicznych reakcji poprzetoczeniowych.

Tabela 18.1: Rodzaj poprzetoczeniowych reakcji immunologicznych

Poprzetoczeniowe reakcje immunologiczne	
wczesne	opóźnione
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ostra reakcja hemolityczna</li> <li>- gorączkowa reakcja niehemolityczna</li> <li>- anafilaksja</li> <li>- reakcje alergiczne</li> <li>- poprzetoczeniowe ostre uszkodzenie płuc (TRALI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- opóźniona reakcja hemolityczna</li> <li>- poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciw biorcy (TA-GvHD)</li> <li>- immunomodulacja (TRIM)</li> <li>- skaza poprzetoczeniowa</li> <li>- aloimmunizacja do antygenów krwinek czerwonych, białych, płytkowych lub białek osocza</li> </ul>

Z kolei, w zależności od nasilenia objawów można wyróżnić ciężkie i lekkie reakcje poprzetoczeniowe. Do ciężkich immunologicznych reakcji po przetoczeniu składników krwi zalicza się: ostry odczyn hemolityczny, ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (ang. *transfusion related acute lung injury*, TRALI), anafilaksję, poprzetoczeniową chorobę przeszczep przeciw biorcy (ang. *transfusion associated graft versus host disease*, TA-GvHD). Do lekkich zaś: niehemolityczne odczyny gorączkowe i alergiczne.

Zasadą jest, że jakiegokolwiek niepożądane reakcje pojawiające się w czasie przetaczania składników krwi powinny budzić podejrzenie reakcji poprzetoczeniowej, jeżeli nie ma dowodów na inne ich pochodzenie [1]. Z laboratoryjnego punktu widzenia o każdej niepożądanej reakcji poprzetoczeniowej należy poinformować szpitalny bank krwi lub pracownię serologii transfuzjologicznej. Są to jednostki organizacyjne, które koordynują badania konieczne w analizie reakcji, wymieniają informacje z klinicystami, doradzają wybór składnika krwi w przypadku dalszych przetoczeń.

Natychmiastowe immunologiczne niepożądane reakcje poprzetoczeniowe łatwiej przypisać konkretnemu przetoczeniu składnika krwi niż reakcje opóźnione. Chociaż u chorych w bardzo ciężkim stanie mogą one przebiegać nierozpoznane [2]. Objawy ostrych reakcji poprzetoczeniowych są podobne bez względu na przyczynę, wobec tego badanie przyczyn i leczenie są z konieczności równoczesne. Z reguły, bez trudności można rozróżnić przyczyny opóźnionych reakcji poprzetoczeniowych, ale, z kolei, ze względu na czas ich pojawienia się nie zawsze można powiązać z konkretnym przetoczeniem [2].

W Tabeli 18.2 przedstawiono sposób postępowania, który należy natychmiast wdrożyć w przypadku rozpoznania ostrej poprzetoczeniowej reakcji.

Częstość występowania immunologicznych reakcji poprzetoczeniowych bardzo trudno ocenić, ponieważ większość chorych otrzymuje więcej niż jedną jed-



Tabela 18.2: Sposób postępowania i rodzaj badań natychmiast wykonywanych w przypadku rozpoznania ostrej reakcji poprzetoczeniowej

Czynniki diagnozujące ostrą reakcję poprzetoczeniową	Rodzaj badania / postępowania
Hemoliza	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ocenić wizualnie kolor surowicy i moczu chorego. Jest to pierwszy, uchwytany objaw ostrej reakcji poprzetoczeniowej</li> <li>- oznaczyć stężenie hemoglobiny wolnej w surowicy i moczu chorego</li> <li>- ocenić obraz krwi - obecność sferocytów</li> <li>- oznaczyć stężenie bilirubiny i dehydrogenazy mleczanowej (LDH)</li> </ul>
Nie zgodność	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ocenić prawidłowość identyfikacji chorego</li> <li>- sprawdzić dokumentację przetoczenia</li> <li>- powtórzyć oznaczenie antygenów ABO przed i po przetoczeniu, ponownie oznaczyć grupę krwi dawców</li> <li>- przeprowadzić badanie przeglądowe w kierunku przeciwciał skierowanych do antygenów na krwinkach czerwonych przed i po przetoczeniu</li> <li>- powtórzyć próbę zgodności serologicznej z próbkami krwi pobranymi przed i po przetoczeniu</li> <li>- wykonać bezpośredni odczyn antyglobulinowy (BTA) z próbkami krwi pobranymi przed i po przetoczeniu</li> </ul>
Zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrz-naczyniowego	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wykonać badanie morfologii krwi</li> <li>- oznaczyć parametry układu krzepnięcia</li> <li>- oznaczyć produkty degradacji fibrynogenu lub D-dimery</li> </ul>
Niewydolność nerek	<ul style="list-style-type: none"> <li>- oznaczyć stężenie niektórych parametrów nerkowych: mocznika, kreatyniny, elektrolitów</li> </ul>
Zaburzenia immunologiczne	<ul style="list-style-type: none"> <li>- oznaczyć stężenie immunoglobuliny klasy A (IgA)</li> <li>- przeprowadzić badanie w kierunku obecności przeciwciał anti-IgA</li> </ul>

nostkę koncentratu krwinek czerwonych, ponadto, istnieje duża różnorodność w sposobie raportowania i ocenie ciężkości reakcji poprzetoczeniowej [3]. Najczęściej zgłaszane są immunologiczne reakcje poprzetoczeniowe o przebiegu ciężkim, np. reakcja hemolityczna, anafilaksja, ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc. Występują one rzadko i według SHOT (ang. *serious hazards of transfusion*), rejestru reakcji poprzetoczeniowych w Wielkiej Brytanii, częstość ich występowania wynosi 10:100.000 przetoczonych jednostek składników krwi [3]. Częstość występowania immunologicznych niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych przedstawia Tabela 18.3 [4].

Tabela 18.3: Częstość występowania immunologicznych niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (modyfikacja własna) [4].

Rodzaj poprzetoczeniowej reakcji immunologicznej	Ocena ryzyka / przetoczona jednostka składnika krwi
Niezhgodność w układzie ABO	1:30.000 – 60.000
objawowa	40%
zgon	1:600.000
Opóźnione reakcje hemolityczne	1:6.700
Ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (TRALI)	1:8.000
Choroba przeszczep przeciw biorcy (GvHD)	rzadko
Niehemolityczne reakcje gorączkowe poprzetoczeniowe	
- po przetoczeniu krwinek czerwonych (ubogoleukocytarne/bez zubożenia w leukocyty)	1:300 / 1:200
- po przetoczeniu płytek krwi (ubogoleukocytarne/bez zubożenia w leukocyty)	1:25-50 / 1:5-20
Reakcje alergiczne	1:30 – 100
Reakcje anafilaktyczne	1:150.000
Skaza poprzetoczeniowa małopłytkowa	rzadko
Immunomodulacja	nieznana

Istotą immunologicznych reakcji poprzetoczeniowych jest reakcja pomiędzy antygenami krwinek (czerwonych, białych, płytkowych), a specyficznymi dla tych antygenów przeciwciałami. Proces ten przebiega w trzech fazach: 1) wiązanie się przeciwciał z antygenami krwinek, czasem z aktywacją układu dopełniacza bezpośrednio w krążeniu; 2) interakcja krwinek z monocytami i makrofagami, na których występują receptory rozpoznające fragmenty Fc przeciwciał i aktywowanie fagocytozy lub cytotoksyczności zależnej od przeciwciał; 3) uwalnianie mediatorów reakcji zapalnej [5].

Reakcjami poprzetoczeniowymi bezpośrednio zagrażającymi życiu są reakcje hemolityczne, które są wynikiem przyspieszonego niszczenia krwinek czerwonych (ang. *haemolytic transfusion reaction*, HTR) [1]. Istnieją dwa mechanizmy hemolizy immunologicznej: pierwszy - niszczenie wewnątrznaczyniowe, na skutek aktywacji układu dopełniacza bezpośrednio w naczyniach krwionośnych. Z reguły dochodzi do uruchomienia drogi klasycznej przez przeciwciała klasy IgM lub IgG wiążące dopełniacz. Klasycznie, obraz ciężkiej reakcji hemolitycznej poprzetoczeniowej obserwuje się w przypadku przetoczenia krwi niezgodnej w układzie ABO. Objawy występują w ciągu kilku minut od rozpoczęcia przetoczenia. Hemolizę wewnątrznaczyniową wywołują przeciwciała skierowane przeciw antygenom: A, B, P, Kidd i Lewis. Drugi mechanizm - niszczenie pozanaczyniowe, zachodzi wówczas, gdy krwinki opłaszczone przeciwciałami ulegają fagocytozie przy udziale makrofagów wyposażonych w receptor dla fragmentu Fc i składowej C3b dopełniacza. Przeciwciała na krwinkach należą do klasy IgG

i słabiej niż immunoglobuliny „naturalne” aktywują układ dopełniacza. Najczęściej skierowane są do antygenów układu Rh (ale nie do antygeny D), Kell, Duffy i Kidd [5]. Niszczenie takie przebiega wolniej, a do krążenia uwalniane są mniejsze ilości wolnej hemoglobiny.

Reakcje hemolityczne są uwarunkowane czasem i mechanizmem niszczenia krwinek czerwonych. Zależą one ponadto od właściwości i stężenia aloprzeciwciał, siły antygeny wyrażającej się liczbą jego determinant na krwince oraz aktywności dopełniacza. Przebieg kliniczny reakcji hemolitycznej zależy także od objętości przetoczonej niezgodnej krwi. Przy czym warto zauważyć, że objętość nie ma znaczenia decydującego, chociaż masywne przetoczenie niezgodnej krwi wpływa na ciężkość przebiegu reakcji [5].

## 18.2. Ostra hemolityczna reakcja poprzetoczeniowa

Ostra hemolityczna reakcja poprzetoczeniowa występuje głównie po przetoczeniu krwi pełnej lub koncentratu krwinek czerwonych. Może ona również wystąpić po przetoczeniu koncentratu krwinek płytkowych, osocza lub innych produktów osoczo pochodnych zawierających przeciwciała do antygenów czerwono-krwinkowych biorcy [8]. Częstość występowania reakcji hemolitycznych po przetoczeniu składników krwi określana jest od 1:30000 do 1:60000 jednostek przetoczonej krwi [5]. Natomiast śmiertelność w wyniku ostrej reakcji hemolitycznej wynosi 1:100000 do 1:600000 przetoczonych jednostek krwi [6]. Nieco inaczej przedstawia się częstość występowania poprzetoczeniowych reakcji hemolitycznych u chorych, u których dokonano przetoczeń. Określana jest ona między 1:854 a 1:524 i jest dużo wyższa niż w przeliczeniu na przetoczone jednostki krwi [5].

Immunologicznemu niszczeniu ulegają zazwyczaj przetaczane krwinki dawcy, sporadycznie występuje sytuacja odwrotna, kiedy znajdujące się w przetaczanym osoczu przeciwciała niszczą korespondujące z nimi krwinki czerwone chorego [6]. Tego rodzaju reakcja ma zwykle łagodniejszy przebieg, ponieważ ilość przetoczonych przeciwciał jest mniejsza i ulegają one rozcieńczeniu w krążącej objętości osocza biorcy. W Tabeli 18.4 przedstawiono przyczyny hemolizy krwinek w ostrej poprzetoczeniowej reakcji hemolitycznej.

Interakcja pomiędzy przeciwciałem i odpowiadającym mu antygenem inicjuje proces patofizjologiczny ostrej reakcji hemolitycznej, sterowany immunologicznie przez aktywację komplementu i hemolizę wewnątrznaczyniową [7].

Hemoliza immunologiczna z aktywacją dopełniacza klinicznie niesie ze sobą trzy główne powikłania: hipotensję, zaburzenie perfuzji tkanek i narządów, głównie nerek, oraz aktywację płytek krwi i kaskady krzepnięcia, której skutkiem jest rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (ang. *disseminated intravascular coagulation*, DIC) [1, 6]. W przypadku aktywacji dopełniacza uruchomione zostają kolejne składniki „klasycznej drogi”, aż do zsyntetyzowania na błonie krwinki czerwonej kompleksu ataku (ang. *membrane attack complex*, MAC). Związanie tego kompleksu prowadzi do uszkodzenia błony krwinek czerwonych z uwolnieniem do osocza zrzębu, hemoglobiny i enzymów [5, 6]. Do przestrzeni naczynio-

Tabela 18.4: Przyczyny hemolizy krwinek czerwonych w ostrej hemolitycznej reakcji poprzetoczeniowej.

Niszczenie krwinek czerwonych	
dawcy	biorcy
Występujące naturalne lub odpornościowe aloprzeciwciała (anty-A, anty-B, anty-Kell, anty-Jka; anty: Fya)	Niezgodność w układzie ABO przetaczanych płytek krwi, osocza, krioprecypitatu lub produktów osoczopochodnych
Autoprzeciwciała	Przetaczanie dużych objętości hipotonicznych płynów
Przeciwciała indukowane przez leki	Mechaniczne niszczenie, np. sztuczne zastawki serca, zespoły mikroangiopatyczne
Zakażenie bakteryjne	
Uszkodzenie mechaniczne podczas toczenia lub w krążeniu pozaustrojowym	
Uszkodzenie termiczne	

wej uwalniane są także anafilatoksyny, włącznie ze składnikiem C3a i C5a dopełniacza [1]. Produkty te są bezpośrednią przyczyną hipotensji. Ponadto, ich interakcje z komórkami tuczными powodują degranulację komórek i uwalnianie kolejnych amin wasoaktywnych – histaminy i serotoniny [5, 6]. Uwolnione do krążenia aminy przyczyniają się do skurczu małych tętnic i wzrostu ich przepuszczalności, powodując niedokrwienie nerek [6]. Kompleks antygen – przeciwciało może aktywować czynnik Hagemana (czynnik XIIa), który z kolei oddziałując na system kinin doprowadza do usuwania bradykininy. Bradykinina zwiększa przepuszczalność naczyń włosowatych i rozszerza tętniczki [8]. Ponadto, hipotensja może być skutkiem wysokiego stężenia czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumour necrosis factor*, TNF) oraz interleukin: IL-1; IL-6 oraz IL-8, które to cytokiny uwalniane są w immunologicznej reakcji hemolitycznej spowodowanej niezgodnością ABO [7].

Ciężkim powikłaniem w następstwie ostrej reakcji hemolitycznej jest rozsiane krzepnięcie śródnacyniowe [6]. W przebiegu reakcji pod wpływem interakcji kompleksu antygen-przeciwciało komórki śródbłonna syntetyzują i uwalniają do krwi krążącej prozapalne cytokiny. Cytokiny aktywują kolagenozę, przyczyniając się do uszkodzenia układu sercowo-nacyniowego, upośledzają funkcję antykoagulacyjnego układu białka C, aktywują krwinki płytkowe i krzepnięcie oraz tłumią układ fibrynolizy. W następstwie uogólnionej aktywacji krzepnięcia powstają liczne zakrzepy głównie w mikrokrążeniu i są kolejną przyczyną niedokrwienia nerek. Następuje zużycie płytek krwi, fibrynogenu i innych czynników krzepnięcia objawiające się skazą krwotoczną [5].

Objawy zwiastujące poprzetoczeniową reakcję hemolityczną występują w przypadkach ciężkich, zazwyczaj podczas, rzadziej po przetoczeniu krwinek czerwonych. Należą do nich: bóle głowy, nudności, dreszcze, gorączka. W przypadkach o przebiegu łagodnym oprócz objawów zwiastujących może pojawić się krótkotrwała hemoglobinuria, czasem tylko niewytłumaczalny spadek liczby krwinek czerwonych i wskaźnika hematokrytowego. W przypadkach ciężkich występują objawy wstrząsu o różnym nasileniu i czasie trwania. Ostra skaza krwo-

toczna, mogąca być objawem dominującym, występuje u 15% chorych. Skąpomocz lub bezmocz występuje u ok. 50% chorych. Hemoglobinuria jest objawem stałym. Żółtaczką o niewielkim nasileniu pojawia się zazwyczaj w 1 lub 2 dobie [1, 7].

### Diagnostyka laboratoryjna ostrej poprzetoczeniowej reakcji hemolitycznej

Pojawienie się objawów reakcji poprzetoczeniowej wymaga natychmiastowego przerwania przetoczenia i podjęcia działań pozwalających na jak najszybsze ustalenie przyczyny niepożądanego reakcji i podjęcia odpowiedniego leczenia. Służą temu między innymi badania laboratoryjne przedstawione w Tabeli 18.5.

Tabela 18.5: Rodzaj badań wykonywanych w przypadku wystąpienia ostrej hemolitycznej reakcji poprzetoczeniowej.

Rodzaj materiału	Rodzaj badania
Próbka krwi pobrana z pojemnika zawierającego składnik krwi	Ponowne oznaczenie grupy krwi w układzie ABO i Rh (D) oraz wykonanie badania przeglądowego w kierunku przeciwciał
Próbka krwi pobrana od chorego, u którego wystąpiła reakcja	Ponowne oznaczenie grupy krwi w układzie ABO i Rh (D) wykonanie badania przeglądowego w kierunku przeciwciał, ponowne wykonanie próby zgodności serologicznej, (badania te należy wykonać z próbki krwi pobranej przed przetoczeniem i po przetoczeniu) Bezpośredni odczyn antyglobulinowy (BTA; bezpośredni odczyn Coombsa) Identyfikacja wykrytych przeciwciał Morfologia krwi i liczba płytek krwi Badanie moczu w kierunku hemoglobinurii Stężenie bilirubiny w osoczu Ocena czynności nerek (stężenie kreatyniny) Koagulogram: czas protrombinowy, czas trombinowy, APTT, fibrynogen, produkty degradacji fibrynogenu

Pierwsza grupa badań potwierdza istnienie hemolizy i ocenia zdolność krwi do przenoszenia tlenu (wartość hematokrytu i stężenie hemoglobiny).

Makroskopowa ocena osocza biorcy, u którego wystąpiła reakcja hemolityczna i hemoglobinemia pozwala wykryć stężenie hemoglobiny rzędu 20-50 mg/dl, co stanowi ekwiwalent 10 ml hemolizowanych krwinek czerwonych u dorosłego osobnika [7]. W niektórych przypadkach reakcja hemolityczna może wystąpić z przyczyn nieimmunologicznych, np.: zakażenie bakteryjne, uszkodzenie mechaniczne, osmotyczne lub termiczne krwinek oraz w przebiegu hemoglobinopatii. Przeszkórna wewnątrznaczyniowa trombektomia może również spowodować hemoglobinemię [5]. Natomiast fałszywie ujemne wyniki badań w kierunku wolnej hemoglobiny mogą wystąpić, jeżeli próbka krwi pobrana po wystą-

pieniu objawów reakcji hemolitycznej zbyt późno została dostarczona do laboratorium. Niskie stężenia wolnej hemoglobiny mogą być trudne do oznaczenia w próbkach krwi pobranych od chorych na żółtaczkę.

Badaniem, które pozwala na szybkie rozpoznanie poprzetoczeniowej reakcji hemolitycznej i wykluczenie problemów związanych z oznaczeniem wolnej bilirubiny jest bezpośredni odczyn antyglobulinowy (BTA, bezpośredni odczyn Coombsa) wykonywany z próbki krwi pobranej po przetoczeniu. Dla poprawnej interpretacji wyniku testu, w przypadku BTA dodatniego wykonywanego z próbki krwi pobranej po wystąpieniu objawów reakcji poprzetoczeniowej, badanie należy wykonać w próbce krwi pobranej przed przetoczeniem.

Czasem pomimo rozpoznawanej immunologicznej reakcji hemolitycznej wynik testu BTA jest ujemny. Występuje to w sytuacji, gdy w krążeniu znajdują się krwinki dawcy opłaszczone aloprzeciwciałami w niskim mianie. Wówczas rutynowe techniki zastosowane do wykonania BTA mogą być mało czułe. Badania bezpośredniego testu antyglobulinowego przeprowadzone przez Alvareza i wsp., w których porównano czułość techniki z zastosowaniem monospecyficznego surowicy antyglobulinowej, elucji przeciwciał i cytometrii przepływowej wykazały, że BTA metodą klasyczną był dodatni przy 10% stężeniu opłaszczonych przeciwciałami krwinek czerwonych. Natomiast technika elucji i cytometrii przepływowej pozwala na uzyskanie dodatniego wyniku BTA już przy 1% stężeniu opłaszczonych krwinek [9].

Druga grupa badań wykonywanych obowiązkowo w przypadku analizy reakcji poprzetoczeniowej obejmuje badania serologiczne, które muszą zawierać oznaczenia grupy krwi ABO i Rh(D), przeglądowe badanie w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych, powtórzenie próby zgodności serologicznej oraz należy sprawdzić, czy na krwinkach czerwonych wykrywa się przeciwciała, składniki dopełniacza lub kompleksy immunologiczne. Badania te mają dwójaki cel. Po pierwsze służą do wykluczenia błędu laboratoryjnego popełnionego w badaniach serologicznych, szczególnie w oznaczeniu grupy krwi i próbie zgodności serologicznej, wykonywanych przed przetoczeniem. Po drugie, w celu powtórzenia badań w próbce krwi pobranej po przetoczeniu lub przerwaniu przetoczenia po obserwacji objawów reakcji poprzetoczeniowej, aby, z kolei, wykluczyć błędy w identyfikacji chorego [2].

### **18.3. Opóźniona hemolityczna reakcja poprzetoczeniowa**

Zgodnie z definicją, opóźniona hemolityczna reakcja poprzetoczeniowa (ang. *delayed haemolytic transfusion reaction*, DHTR) pojawia się po upływie 24 godzin od przetoczenia jednostki krwi odpowiedzialnej za wystąpienie reakcji. Cechą charakterystyczną tej reakcji jest brak serologicznych niezgodności w badaniach wykonywanych przed przetoczeniem. Klasycznie, opóźniona poprzetoczeniowa reakcja hemolityczna występuje u chorych, którzy zostali zimmunizowani w czasie wcześniejszych przetoczeń lub ciąży. Oznacza to, że w badaniach wykonanych przed planowanym przetoczeniem nie wykryto przeciwciał odpowiedzialnych za wystąpienie reakcji hemolitycznej [10]. Opóźnione działa-

nie przeciwciał jest skutkiem wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Przetoczona krew pobudza komórki pamięci chorego, stymulując wytwarzanie aloprzeciwciał skierowanych do korespondujących z nimi antygenów na przetoczonych krwinkach [10].

W przypadkach typowych, mamy do czynienia z hemolizą pozanacyniową. Może pojawić się również hemoliza wewnątrznacyniowa lub mogą współistnieć oba rodzaje hemolizy [2, 7, 10].

Kliniczne objawy opóźnionych reakcji hemolitycznych mają mniejsze nasilenie niż w przypadku ostrych reakcji poprzetoczeniowych. Często można ich nie zauważyć. U niektórych chorych obserwuje się tylko niespodziewane pojawienie się niedokrwistości. Inne objawy kliniczne to: gorączka, dreszcze, ból, duszność i żółtaczka. Rzadko występuje hemoglobinuria. Jej pojawienie się zależy od specyficzności przeciwciał. Przeciwciała odpowiadające za opóźnioną reakcję hemolityczną są cząsteczkami IgG, które wiążą lub nie dopełniają. Ich swoistość jest najczęściej skierowana do antygenów z układu Rh, Kidd, antygeny K, układu Duffy i układu MNS [5]. Swoistość przeciwciał wywołujących reakcje hemolityczne przedstawiono w Tabeli 18.6 [7].

Tabela 18.6: Swoistość przeciwciał wywołujących reakcje hemolityczne [7].

<b>Reakcja hemolityczna z niszczeniem wewnątrznacyniowym krwinek</b>	<b>Reakcja hemolityczna z niszczeniem zewnątrznacyniowym krwinek</b>
Anty -A, -B, -H w fenotypie Bombay	
	przeciwciała skierowane do układu Rh: anty-C; anty-c; anty-E; anty-e; anty-D
anty-K	anty-K
anty-JKa	anty-Jk <sup>a</sup> ; Jk <sup>b</sup> ; Jk <sup>3</sup>
	anty-Fy <sup>a</sup> ; anty-Fy <sup>b</sup>
	anty-M; anty-S; anty-s; anty-U
anty-Le <sup>a</sup>	

W około 50% przypadków przeciwciała wytworzone po przetoczeniu krwi lub po ciąży nie są wykrywane po kilku miesiącach. Czas ten zależy od swoistości przeciwciał i indywidualnych cech układu odporności. W około 10% przypadków testami serologicznymi wykrywa się więcej niż jedną swoistość aloprzeciwciał [1].

Pomijając kilka opisanych przypadków, opóźnione hemolityczne reakcje poprzetoczeniowe posiadają wspólne cechy: 1) występują u chorych, którzy zostali zimmunizowani wcześniej wykonanymi przetoczeniami lub ciążami; 2) przeciwciała nie są wykrywane w badaniu przeglądowym przed przetoczeniem krwi; 3) objawy opóźnionej reakcji poprzetoczeniowej pojawiają się 3 do 10 dni po przetoczeniu; 4) przeciwciała niewykrywane w badaniach przed przetoczeniem są zidentyfikowane w próbkach krwi pobranych po przetoczeniu [10].

## Aspekty diagnostyczne opóźnionych hemolitycznych reakcji poprzetoczeniowych

W badaniach laboratoryjnych stwierdza się niedokrwistość, podwyższone stężenie dehydrogenazy mleczanowej, bilirubiny, obniżenie stężenia haptoglobiny oraz podwyższoną liczbę krwinek białych. Jednak w około 35% przypadków opóźnionych poprzetoczeniowych reakcji hemolitycznych nie obserwuje się żadnych objawów klinicznych i laboratoryjnych hemolizy. Na wystąpienie reakcji wskazują jedynie badania serologiczne. W badaniach stwierdzono bardzo słabą korelację między serologicznymi wynikami badań w kierunku wystąpienia opóźnionej reakcji hemolitycznej a klinicznymi objawami jej wystąpienia [10]. Dlatego też w tych przypadkach rozpoznaje się obecnie opóźnioną poprzetoczeniową reakcję serologiczną (ang. *delayed serological transfusion reaction*, DSTR). Konsekwencją jej zdiagnozowania jest wpis wykrytych aloprzeciwciał w dokumentacji chorego.

Nie wszystkie wykryte przeciwciała powodują reakcję hemolityczną lub przyspieszają niszczenie krwinek czerwonych na powierzchni, których znajduje się antygen z nimi korespondujący. Niektóre z nich powszechnie uznane za nieistotne klinicznie nie powodują hemolizy krwinek. W Tabeli 18.7 przedstawiono podział przeciwciał istotnych i nieistotnych klinicznie.

Tabela 18.7: Istotność kliniczna przeciwciał i ich swoistość do antygenów z układów grupowych krwinek czerwonych [1].

Istotne klinicznie	Czasami istotne klinicznie	Mogą być istotne klinicznie, gdy reagują w temp. 37°C	Nieistotne klinicznie
ABO, H	August	A	Bg
Układ Rh	Cartwright	Anton	Chido / Rogers
Układ Duffy	Colton	I	Cost
Układ Kell	Cromer	Lewis	
Układ Kidd	Dombrock	Lutheran	
MNS	Gerbich	MNS	
Diego	Scianna	P	
Vel	Gil	Sid	
Globoside	LW		
Lan	Indian		
	XK		

Uznanie braku istotności klinicznej przeciwciała nie zawsze jest takie proste. Antygen Bg jest dobrym przykładem kontrowersji wokół tego problemu. Jest on przenoszony na cząsteczkach HLA klasy I, których ekspresja na krwinkach czerwonych jest słabo i zmiennie wyrażona. Antygen-Bga należy do powszechnych i występuje u 1,5% populacji i 10% chorych, którzy są wielokrotnymi biorcami



składników krwi [1, 11]. Przetoczenia krwinek czerwonych wobec niezgodności do antygeny Bg są powszechne i nie noszą ze sobą reakcji poprzetoczeniowych. Niemniej opisywane są reakcje hemolityczne spowodowane przeciwciałami do antygeny Bg [11].

## Badania serologiczne

W klasycznym przypadku opóźnionej hemolitycznej reakcji poprzetoczeniowej obserwujemy:

- 1) dodatni wynik BTA, który na ogół jest widoczny w postaci dwóch populacji krwinek czerwonych. Zalecane jest wykonanie badania z próbki krwi pobranej po obserwacji reakcji poprzetoczeniowej. Jednak badanie to ma małą wartość predykcyjną dla reakcji hemolitycznej. U chorych hospitalizowanych obserwuje się wysoką prevalencję dla dodatniego wyniku BTA. Około 6% próbek krwi poddanych badaniu przed przetoczeniem wykazało BTA dodatni z surowicą anti-IgG. Wartość predykcyjna dla wykrycia obecności nowowytworzonych aloprzeciwciał w tych próbkach wyniosła tylko 0,29% [5].
- 2) obecność aloprzeciwciał w eluacie krwinek czerwonych, osoczu lub w obu badaniach. Zazwyczaj przeciwciała zaczynają być wykrywane po 3-7 dniach po przetoczeniu. Wykrywa się je w pośrednim teście antyglobulinowym (PTA) i w testach enzymatycznych. Badania te należy wykonać przy użyciu wzorcowych krwinek alogenicznych i krwinek autologicznych chorego. U niektórych chorych, u których rozpoznano opóźnioną reakcję hemolityczną nie wykrywa się przeciwciał przy stosowaniu rutynowych testów. Zastosowanie dodatkowych testów, np. testu polibrenowego, pozwala na identyfikację aloprzeciwciał. Pojedynczy chorzy dla wykrycia i identyfikacji przeciwciał wymagają badania czasu przeżycia krwinek czerwonych znakowanych Cr<sup>51</sup> [12].

Oprócz aloimmunologicznej hemolizy reakcje poprzetoczeniowe mogą mieć również inne podłoże immunologiczne. Mechanizm niszczenia krwinek czerwonych w tych przypadkach określany jest jako cytoliza „przypadkowego świadka” („*bystander immune cytotoxicity*”) [5]. Hemolizę powodują przeciwciała skierowane do antygenów obecnych na innych komórkach krwi, np. leukocytach, płytkach krwi, natomiast krwinki czerwone ulegają zniszczeniu przy udziale dopełniacza „przypadkowo”. Przypuszczalnie jedną z przyczyn takiej hemolizy jest przyłączenie zaktywowanego kompleksu C 5,6,7 dopełniacza do błony krwinek czerwonych znajdujących się z pobliżu reakcji immunologicznej [6].

## 18.4. Niehemolityczna gorączkowa reakcja poprzetoczeniowa

Gorączkowa niehemolityczna reakcja poprzetoczeniowa (ang. *febrile nonhemolytic transfusion reactions*, FNHTR) definiowana jest jako wzrost ciepłoty ciała o 1°C lub więcej w czasie przetoczenia lub bezpośrednio po nim [13].

Gorączce mogą towarzyszyć dreszcze, uczucie zimna, czasami objawy wtórne, takie jak ból głowy, nudności i wymioty. Przy czym należy zauważyć, że obserwacja objawów wtórnych, bez wzrostu ciepłoty ciała nie może stanowić o rozpoznaniu reakcji gorączkowej. Natomiast pojawienie się dreszczy z lub bez wzrostu ciepłoty ciała może być klasyfikowana jako niehemolityczna gorączkowa reakcja poprzetoczeniowa, jeżeli objaw koreluje z dokonanym przetoczeniem i zostaną wykluczone inne przyczyny (14). Reakcja gorączkowa zwykle trwa nie dłużej niż 8 do 12 godzin po rozpoczęciu przetoczenia.

Gorączkowa niehemolityczna reakcja poprzetoczeniowa jest zwykle związana z przetoczeniem komórkowych składników krwi. Występuje dużo częściej po przetoczeniu koncentratu krwinek płytkowych – 4,6% niż koncentratu krwinek czerwonych, dla którego częstość występowania określono na 0,33% [15]. Ryzyko pojawienia się reakcji gorączkowej zależy od wielu czynników, takich jak: obecność leukocytów w składnikach krwi, czasu przechowywania, charakterystyki dawcy, w tym leków, które przyjmował przed donacją.

Niehemolityczna gorączkowa reakcja poprzetoczeniowa jest częścią zespołu systemowej odpowiedzi zapalnej (ang. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS). Wywołana jest obecnością w składnikach krwi leukocytów i przeciwciał antyleukocytarnych u chorych lub przetoczeniem rozpuszczalnych mediatorów zapalnych nagromadzonych w czasie przechowywania. Zatem, gorączkowa reakcja poprzetoczeniowa może mieć dwie przyczyny: 1) bardziej „klasyczna”, na skutek reakcji antygen-przeciwciało z udziałem dopełniacza aktywowane są makrofagi biorcy, które stymulują uwalnianie cytokin; 2) przetoczenie cytokin zapalnych takich jak IL-1; IL-6; TNF- $\alpha$  i innych mediatorów reakcji zapalnej (np. składniki dopełniacza, lipopolisacharydy lub lipidy aktywujące neutrofile), które gromadzą się w komórkowych składnikach krwi podczas przechowywania (14). Cytokiny zapalne indukują wystąpienie gorączki poprzez zaburzenia funkcji ośrodka regulacji temperatury w podwzgórzu. Mechanizm ten wspierany jest związkiem reakcji gorączkowej z odmianą polimorficzną IL-1 o genotypie IL-1 RN\*2,2 [16]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na to, że gorączkową niehemolityczną reakcję poprzetoczeniową mogą powodować niecytokinowe czynniki obecne w składnikach krwi. Potwierdzają to obserwacje kliniczne występowania reakcji po przetoczeniu składników krwi o zmniejszonej liczbie leukocytów.

## 18.5. Ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc

Ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (ang. *transfusion related acute lung injury*, TRALI) definiowane jest jako ostra niewydolność oddechowa pojawiająca się w czasie lub w ciągu 6 godzin po przetoczeniu jednej lub więcej jednostek składnika krwi u chorych bez czynników ryzyka zaburzeń układu oddechowego [17].

TRALI może być rozpoznane tylko wówczas, jeżeli objawy reakcji wystąpiły po przetoczeniu, rzadziej w czasie jego trwania, a nie były obserwowane przed przetoczeniem. Ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc rozpoznaje się poprzez wykluczenie innych przyczyn ostrej niewydolności oddechowej. W Tabeli 18.8

Tabela 18.8: Objawy ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc.

**Objawy TRALI**

- ostra niewydolność oddechowa po przetoczeniu składników krwi
- objawy niedotlenienia  $PaO_2/FiO_2 \leq 300$  mmHg
- obustronne nacieki płuc widoczne w badaniu radiologicznym klatki piersiowej
- brak objawów przeciążenia lewego przedsionka
- wystąpienie objawów podczas lub w czasie 6 godzin po zakończeniu przetoczenia

**Objawy TRALI u chorych z czynnikami ryzyka niewydolności oddechowej**

- pogorszenie niewydolności oddechowej podczas lub w ciągu 6 godzin po zakończeniu przetaczania składników krwi zawierających osocze
- kliniczne objawy sugerujące TRALI, u chorych z niewydolnością oddechową, o ustalonych przyczynach i stabilnym stanem ogólnym przed przetoczeniem

przedstawiono objawy TRALI stanowiące konsensus grupy roboczej National Heart, Lung, and Blood Institute [17].

Częstość występowania ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc w USA przed 2007 r. oceniane było między 1:4000 a 1:5000 przetoczonych jednostek. Obecnie, po zastosowaniu postępowań zapobiegawczych (przetaczanie składników ubogoleukocytarnych unikanie przetaczania osocza pochodzącego od wieloródek, rygorystyczne wskazania do przetoczenia osocza) częstość ta wynosi 1:12000 przetoczonych jednostek krwi, śmiertelność szacowana jest na ok. 6% [17].

W patogenezie TRALI istotną rolę odgrywiają przeciwciała reagujące z antygenami leukocytów (anty-HLA) lub reagujące ze swoistymi antygenami granulocytów (anty-HNA), przetoczone choremu w składniku krwi [18]. Przeciwciała reagują głównie z granulocytami, ale w reakcję wciągane są również monocyty i komórki śródbłonna [19]. Cały proces prowadzi do aktywacji neutrofilii i uwalniania prozapalnych cytokin oraz uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych i zwiększenia przepuszczalności [18].

Istotną obserwacją jest to, że w prawie 1/3 przypadków nie wykrywane są przeciwciała. Badania na modelach doświadczalnych dowiodły, że ważną rolę w etiologii TRALI odgrywiają lipidy bioaktywne znajdujące się w przechowywanych składnikach krwi [18]. W kontrolowanych badaniach przeprowadzonych u chorych poddawanych zabiegom kardiochirurgicznym wykazano, że szczególnym czynnikiem ryzyka jest lisofosfatydylocholina, powodująca aktywację neutrofilii, uwalniania z uszkodzonych błon komórkowych komórek krwi w długo przechowywanych składnikach [20]. Ponadto, stwierdzono również, że lipidy znajdujące się w osoczu przechowywanych ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych mogą *in vitro* aktywować neutrofile [21].

### Diagnostyka laboratoryjna TRALI

Jednoznaczne rozpoznanie poprzetoczeniowego ostrego uszkodzenia płuc jest trudne. Na ogół zaleca się wykonanie elektrokardiogramu, oznaczenie stę-

żenia BNP (ang. *brain natriuretic peptide*), analizę bilansu płynów oraz określenie liczby krwinek białych. Ekg i pomiar stężenia BNP oraz bilans płynów pozwalają wyłączyć niewydolność krążenia jako przyczynę ostrej niewydolności oddechowej. BNP różnicuje również TRALI z przeciążeniem krążenia. Czasowo pojawiająca się leukopenia może w przypadku pojawienia się niewydolności oddechowej sugerować rozpoznanie TRALI [20].

Ważną rolę w badaniach laboratoryjnych odgrywa poszukiwanie przeciwciał anti-HLA i/lub anti-HNA u dawców, których składniki krwi zostały przetoczone, rzadziej u chorych. Niewykrycie u dawców lub u biorcy przeciwciał nie wyklucza poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc. W Tabeli 18.9 przedstawiono rodzaj testów służących do wykrywania przeciwciał.

Tabela 18.9: Rodzaj i cechy testów służących do wykrywania przeciwciał.

<b>Zalecane testy do wykrywania przeciwciał</b>	HNA – immunofluorescencyjny z granulocytami, test aglutynacji, wskazana również MAIGA HLA I – enzymatyczny, fluorocytometryczny, limfocytotoksyczny HLA II – enzymatyczny, fluorocytometryczny
<b>Wymagane antygeny w panelu</b>	HNA – 1a, 1b, -2, -3a HLA klasy II HLA klasy I, A2 i inne o dużej częstości występowania
<b>Dowody udziału przeciwciał w patogenezie TRALI</b>	Dodatnia próba zgodności pomiędzy dawcą i biorcą, a w razie niemożności jej przeprowadzenia – identyfikacja u biorcy/dawcy antygeny reagującego z przeciwciałem

Przeciwciała wykrywa się głównie u dawcy, reagują one wówczas z leukocytami biorcy składników krwi. Rzadziej wykrywa się przeciwciała u biorcy, reagują one wtedy z leukocytami dawcy. Opisywano obecność przeciwciał dawcy, które reagowały z leukocytami innego dawcy składnika krwi przetaczanego temu samemu choremu [18]. W badaniach wykrywa się przeciwciała anti-HLA klasy II, często w wysokim stężeniu, oraz anti-HNA, głównie anti-HNA 3a. Przeciwciała anti-HLA klasy I wykrywa się rzadziej, ponieważ adsorbowane są przez krwinki płytkowe i cząsteczki rozpuszczalne. Ponadto, częstość występowania przeciwciał anti-HLA klasy I jest mniejsza, wynosi 10% niż przeciwciał anti-HLA klasy II – określona jest na 12% [22].

### Metody wykrywania przeciwciał do antygenów HLA

Rutynowym testem do wykrywania przeciwciał anti-HLA jest test limfocytotoksyczny (ang. *lymphocytotoxicity test*, LCT). Metodą tą wykrywane są przeciwciała klasy IgM i IgG skierowane do antygenów HLA, głównie klasy I. W teście LCT badaną surowicę kontaktuje się z limfocytami dawców panelowych oraz składnikami układu dopełniacza. Obecność przeciwciał anti-HLA w surowicy powoduje lizę komórek. Nasilenie reakcji ocenia się na podstawie odsetka martwych komórek w stosunku do wszystkich dodanych.

Kolejnymi stosowanymi testami są testy fluorescencyjne i enzymatyczne z zastosowaniem surowicy antyglobulinowej. W teście z wykorzystaniem surowicy antyglobulinowej sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (ang. *lymphocyte immunofluorescence test*, LIFT) surowicę chorego inkubuje się z limfocytami i dodaje sprzężony odczynnik. Wyniki badań w teście LIFT odczytuje się w cytometrze przepływowym.

W przypadku sprzężenia surowicy antyglobulinowej z enzymem, np. peroksydazą lub fosfatazą zasadową, po dodaniu surowicy chorego uzyskuje się reakcję barwną, której natężenie odczytuje się w spektrofotometrze. Jest to test immunoenzymatyczny ELISA.

W testach fazy stałej, które są testami nowej generacji, wykorzystuje się rozpuszczalne antygeny HLA oczyszczone metodą chromatografii. Tak oczyszczone antygeny opłascza się na powierzchni plastikowych studzienek lub polistyrenowych kulek. Wyniki badania ocenia się w cytometrze lub spektrofotometrze. Testy te cechuje wysoka czułość w wykrywaniu przeciwciał anti-HLA i możliwość identyfikacji rzadkich swoistości [23]. Najpowszechniej do identyfikacji przeciwciał stosuje się fluorymetr przepływowy. W metodzie wykorzystuje się polistyrenowe, fluorescencyjne kuleczki, które pokryte są oczyszczonymi antygenami HLA klasy I lub II. Są one inkubowane z badaną surowicą sprzężoną z barwnikiem fluorescencyjnym - fikoerytryną. Wyniki ocenia się we fluorymetrze. W jednej próbce można równocześnie badać nawet do 100 różnych swoistości przeciwciał [24].

W badaniu przesiewowym przeciwciał anti-HLA stosowany jest test z użyciem krwinek czerwonych, opłaszonych przeciwciałami anti-IgG. Uczulone krwinki czerwone inkubuje się z badaną surowicą, a następnie z surowicą antyglobulinową. Na brak przeciwciał wskazuje aglutynacja krwinek, natomiast obecność przeciwciał anti-HLA nie powoduje aglutynacji krwinek czerwonych.

## **18.6. Poprzetoczeniowa reakcja alergiczna i anafilaktyczna**

Poprzetoczeniowe reakcje alergiczne i anafilaktyczne mogą pojawić się po przetoczeniu każdego ze składników krwi. Na ogół objawiają się pokrzywką, świadem zaczerwienieniem skóry, w przypadkach ciężkich objawami są obrzęk naczyniowy, skurcz oskrzeli, wstrząs oraz niewydolność krążenia. W zależności od nasilenia reakcji alergicznych można wyróżnić: 1) łagodne reakcje alergiczne, z reguły objawiają się miejscowo zlokalizowaną lub rozlaną pokrzywką; 2) reakcję anafilaktoidalną; 3) reakcję anafilaktyczną – najczęściej objawiającą się pod postacią wstrząsu (20,25). Częstość występowania reakcji alergicznych i anafilaktoidalnych waha się od 1:100 do 1:33, natomiast reakcje anafilaktyczne występują z częstością od 1:20.000 do 1:47.000 (0,002% do 0,005%) przetoczeń [20, 26].

Przyczyną reakcji alergicznych jest działanie zewnętrznego alergenu, zwykle białka zawartego w składniku krwi i przeciwciał anti-E chorego. Innym mechanizmem reakcji alergicznej są przeciwciała do antygenów leukocytarnych oraz substancji wazoaktywnych – C3a i C5a lub aktywatorów komórek tucznych, takich

jak leukotrieny [13, 27]. Badania wskazały również na udział histaminy w pojawianiu się reakcji alergicznych. Histamina wykrywana jest w osoczu, w którym przechowywane są płytki krwi lub w części znajdującej się w koncentratkach krwinek czerwonych. Nie jest ona syntetyzowana *de novo* podczas przechowywania składników krwi, pochodzi raczej z rozpadających się komórek krwi [25, 27]. Ponadto gromadzące się w czasie przechowywania komórkowych składników krwi chemokiny takie jak: IL-8; RANTES i MIP-1 $\alpha$  mogą powodować gromadzenie i aktywację bazoili oraz wzrost syntezy histaminy [27].

Przeciwciała anty-IgA obecne w osoczu biorcy są przyczyną poprzetoczeniowych reakcji anafilaktycznych. Reakcja ta, ciężka i bezpośrednio zagrażająca życiu, może pojawić się w kilka sekund lub minut po rozpoczęciu przetoczenia, nawet małej objętości składnika zawierającego osocze [28]. Reakcja anafilaktyczna najczęściej obserwowana jest u chorych z niedoborem IgA lub jednej z subklas lub alotypu IgA. 30% - 40% tych chorych wytwarza przeciwciała klasy IgG lub IgM przeciw immunoglobulinie klasy A [20, 26]. Pomimo tego, nie wszyscy chorzy, u których wykrywa się przeciwciała anty-IgA, reagują anafilaksją na składniki krwi zawierające w swoim składzie IgA. Może to być spowodowane niskim mianem przeciwciał krążących we krwi biorcy [26].

## Diagnostyka laboratoryjna

Diagnostyka laboratoryjna w przypadku poprzetoczeniowych reakcji alergicznych i anafilaktycznych ma dosyć ograniczone możliwości. Ostatnio opisano możliwą przydatność testu aktywacji bazoili w diagnostyce reakcji alergicznych [29].

Wystąpienie reakcji anafilaktycznej wymaga oznaczenia stężenia IgA. Izolowany niedobór immunoglobuliny klasy A jest popularnie występującym pierwotnym niedoborem immunologicznym. Często w praktyce klinicznej występują wtórne niedobory IgA, towarzyszące takim chorobom jak, toksoplazmoza, różyczka lub odra oraz ekspozycji na leki i alkohol. Około 1 na 700 osób w Europie ma ekstremalnie niskie stężenie IgA w osoczu [27]. Z perspektywy alergiczno/immunologicznej praktyki u osoby, u której stwierdza się osoczowe stężenie IgA < 5 mg/dl, można rozpoznać niedobór immunoglobuliny. Występuje również u niej ryzyko wytworzenia przeciwciał anty-IgA [27].

Przed przetoczeniem składników krwi zawierających osocze lub produktów osoczopochodnych (np. preparaty immunoglobulin) należy wykonać badania przesiewowe w kierunku obecności przeciwciał anty-IgA. Hemaglutynacja pośrednia (ang. *passive hemagglutination assay*, PHAA) była pierwszą metodą stosowaną do wykrywania przeciwciał [26]. Wykorzystywała ona krwinki czerwone grupy O opłaszczone szpiczakową IgA zawierającą różne jej podgrupy i alotypy, IgA1, IgA2m (1) i IgA2m (2). Obecnie metoda wykonywana jest w małych laboratoriach referencyjnych. Metodami rozpowszechnionymi do wykrywania przeciwciał anty-IgA są metoda immunoenzymatyczna i radioimmunologiczna [26]. Nowe techniki oznaczania oparte są na metodzie kolumnowo-żelowej [30]. Osocze badane inkubowane jest z czerwonymi polistyrenowymi kuleczkami opłasz-

czonymi immunoglobuliną klasy A. Obecne w surowicy przeciwciała anti-IgA aglutynują kuleczki a wynik odczytywany jest w mikroskopie [30].

## 18.7. Poprzetoczeniowa skaza małopłytkowa

Poprzetoczeniowa skaza małopłytkowa (ang. *post-transfusion purpura*, PTP) jest opóźnioną immunologiczną reakcją poprzetoczeniową. Reakcja występuje rzadko, opisano jedynie pojedyncze przypadki [31].

Objawia się małopłytkowością i skazą krwotoczną występującą 5-10 dni po przetoczeniu, głównie, koncentratu krwinek czerwonych. Przyczyną wystąpienia poprzetoczeniowej skazy małopłytkowej są przeciwciała reagujące ze swoistymi antygenami krwinek płytkowych. Najczęściej wykrywa się przeciwciała przeciwko antygenowi HPA-1a, zlokalizowanemu na glikoproteinie IIIa. Przeciwciała anti-HPA-1a są najczęściej wykrywanymi w surowicy chorych (stanowią 74%) [32]. Innymi wykrywanymi przeciwciałami mogą być anti-HPA-3a, HPA-3b, HPA-5a, HPA-5b. Dodatkowo, przeciwciałom przeciwko specyficznym antygenom płytkowym mogą towarzyszyć przeciwciała anti-HLA i przeciwciała skierowane przeciwko antygenom czerwonych krwinek. Żadne z wymienionych przeciwciał nie jest wykrywane w badaniach przed przetoczeniem. Są one skutkiem wtórnej odpowiedzi immunologicznej na przetoczone antygeny. Reakcja przeciwciał ze swoistymi antygenami krwinek płytkowych powoduje niszczenie nie tylko przetoczonych płytek krwi, ale również własnych chorego. Jest to prawdopodobnie skutkiem udziału kompleksów immunologicznych, które wiążą autologiczne płytki krwi przez receptory Fc oraz adsorpcja rozpuszczalnych antygenów płytkowych z osocza dawcy [32]. W ostatnich latach wykazano, że w poprzetoczeniowej skazie małopłytkowej dochodzi do osłabienia ekspresji antygenów płytkowych u chorego i przejściowego wytworzenia autoprzeciwciał [32].

### Diagnostyka laboratoryjna

Identyfikacja aloprzeciwciał przeciwko krwinkom płytkowym i brak odpowiadającego antygeny na płytkach krwi chorego, pozwalają na postawienie rozpoznania. Przeciwciała skierowane przeciwko płytkom krwi wykrywa się w surowicy chorego lub w formie związanej z krwinkami płytkowymi. Należą one do immunoglobulin klasy G lub, rzadziej, M. Przeciwciała przeciwpłytkowe na ogół nie wiążą dopełniacza i mogą być wykrywane za pomocą pośredniego lub bezpośredniego testu antyglobulinowego ze znakowaną surowicą.

Testem, który znalazł szerokie zastosowanie do wykrywania przeciwciał przeciwpłytkowych jest test z użyciem surowicy antyglobulinowej znakowanej fluoresceiną. Pośredni test immunofluorescencyjny (ang. *platelet immunofluorescence test*, PIFT) służy do wykrywania alo- i autoprzeciwciał w surowicy. Z kolei, bezpośredni test PIFT służy do wykrywania autoprzeciwciał związanych z płytkami krwi. Wyniki obu testów oceniane są w mikroskopie fluorescencyjnym lub w cytometrze przepływowym [33].

Przeciwciała przeciwpłytkowe mogą być również wykrywane testem enzymatycznym ELISA z zastosowaniem surowicy antyglobulinowej sprzężonej z enzy-

mami. Po dodaniu substratu, odpowiedniego dla danego enzymu, występuje reakcja barwna, którą ocenia się w spektrofotometrze. Test jednak jest mało czuły, ponieważ wymaga około 1.000 molekuł IgG związanych na komórce, aby uzyskać dodatnią reakcję.

Wadą testu PIFT i testu enzymatycznego ELISA jest fakt, że wykrywają nie tylko swoiste przeciwciała przeciw płytkowe ale także przeciwciała skierowane do antygenów HLA. Znacznie czulszym testem umożliwiającym wykrycie i identyfikację swoistych przeciwciał przeciw płytkowych jest immunoenzymatyczny test MAIPA (ang. *monoclonal antibody immobilization of platelet antigens*) wykorzystujący przeciwciała monoklonalne skierowane do różnych glikoprotein krwinek płytkowych [33]. Do badań naukowych wykorzystuje się, ponadto, testy radioimmunoprecypitacji lub immunoblottingu. Testy do wykrywania przeciwciał przeciw antygenom płytkowym przedstawiono poniżej:

- Test immunofluorescencyjny (ang. *platelet immunofluorescence test*, PIFT) - pośredni i bezpośredni,
- Test enzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA),
- Test enzymatyczny z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych do GP płytek krwi, (ang. *monoclonal antibody immobilization of platelet antigens*, MAIPA),
- Immunoprecypitacja,
- Immunoblotting.

## 18.8. Poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciw biorcy

Poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko biorcy (ang. *transfusion associated graft versus host disease*, TA-GvHD) jest reakcją poprzetoczeniową, u podstaw której leży stopień niezgodności w zakresie antygenów układu HLA między dawcą i biorcą krwi oraz niezdolność biorcy do odpowiedzi immunologicznej na przetoczone limfocyty T dawcy [34].

Obserwowano również reakcję u immunokompetentnych biorców, którzy byli narażeni na ryzyko wystąpienia TA-GvHD, ponieważ dawca składnika krwi był homozygotą w stosunku do antygenów HLA, dla których biorca był heterozygotą [34]. Wówczas układ immunologiczny biorcy nie rozpoznaje limfocytów T dawcy jako obcych i nie eliminuje ich. Natomiast limfocyty T dawcy rozpoznają antygeny HLA biorcy jako obce i następuje ich proliferacja prowadząca do TA-GvHD [35–37].

Opisano przypadki TA-GvHD u chorych poddawanych zabiegom kardiologicznym [37]. Prawdopodobnym mechanizmem jest przejściowe stłumienie odpowiedzi immunologicznej pacjentów, u których dokonuje się wszczepienia bypass'ów sercowo-płucnych oraz wykonuje zabiegi z użyciem krążenia pozaustrojowego [37,38].

Innym czynnikiem ryzyka poprzetoczeniowej choroby przeszczep przeciw biorcy jest przetaczanie „świeżej” krwi, tzn. przechowywanej krócej niż 4 dni [38].



Zawiera ona dużą liczbę limfocytów, które u biorcy z niesprawnym układem odporności nie są usuwane z krążenia i mogą proliferować [36, 38].

Rozwój TA-GvHD zależy od rozpoznania niezgodności immunologicznej przez komórki T dawcy, wszczęcia bypass'ów sercowo-płucnych i przetoczenia krwi przechowywanej nie dłużej niż 72 godziny. Objawy kliniczne zależą od dysregulacji cytokin, głównie nadmiernej produkcji interleukiny 1 i 2;  $\gamma$ -interferonu i czynnika martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor*, TNF). Stan ten nazywany jest „burzą cytokinową” [34, 35].

Zwykle pierwsze objawy poprzetoczeniowej choroby przeszczep przeciwko biorcy pojawiają się po upływie od 2 do 50 dni po przetoczeniu. Najczęściej pierwszym objawem jest podwyższenie ciepłoty ciała, inne objawy pochodzą z układu pokarmowego skóry i/lub wątroby (39). Często występuje znaczna pancytopenia będąca wynikiem zaburzeń hemopoety, która jest bardzo charakterystyczna dla TA-GvHD [39].

## Diagnostyka laboratoryjna

Diagnostyka poprzetoczeniowej choroby przeszczep przeciw biorcy polega na wykazaniu obecności limfocytów dawcy we krwi biorcy, w korelacji ze stanem klinicznym. W celu wykonania tych badań używane są różne techniki: oznaczanie antygenów HLA, testy cytogenetyczne, amplifikacje genów, oznaczanie różnic genetycznych w regionach o wysokim polimorfizmie [39]. Potwierdzeniem choroby jest badanie patologiczne, przeprowadzone najczęściej na bioptacie skóry. Wykazuje ono agresywny naciek limfocytów.

## 18.9. Immunomodulacja i mikrochimeryzm poprzetoczeniowy

Poprzetoczeniowa immunomodulacja (ang. *transfusion related immunomodulation*, TRIM) jest zjawiskiem biologicznym o bardzo złożonej patogenezie. Początkowo efekt TRIM wiązany był tylko z mechanizmami immunologicznymi. Ostatnio jednak zwraca się uwagę na dwa mechanizmy: immunodulacyjny i prozapalny [40]. Przypuszcza się, że zasadniczą rolę w TRIM odgrywają alogeniczne komórki jednojądrzaste i dendrytyczne oraz krwinki płytkowe. Przetoczenie alogenicznych składników krwi może wywołać albo aloimmunizację albo tolerancję immunologiczną. Każde przetoczenie wprowadza do krwiobiegu biorcy obce antygeny włączając w to antygeny HLA DR znajdujące się na komórkach dendrytycznych dawcy. Obecność lub brak identycznych antygenów HLA-DR na białych krwinkach dawcy odgrywa decydującą rolę w tym, czy po przetoczeniu krwi wystąpi aloimmunizacja, czy immunosupresja (40). Przetoczenie, w których co najmniej jeden antygen HLA DR jest wspólny dla dawcy i biorcy spowodują tolerancję immunologiczną, podczas gdy przetoczenia z pełną niezgodnością HLA DR prowadzą do aloimmunizacji [41]. Istotną rolę odgrywają również rozpuszczalne czynniki immunologicznie antygeny HLA. Udokumentowano kilka zmian w funkcjach układu immunologicznego, które są następstwem przetoczeń skład-

ników krwi. Zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego wykrywane w badaniach laboratoryjnych:

- obniżenie liczby komórek T-helper (CD4),
- obniżenie stosunku T-limfocytów (CD4/CD8),
- obniżenie siły odpowiedzi limfocytów na mitogen,
- obniżenie funkcji komórek NK,
- aktywacja limfocytów B,
- aktywacja limfocytów T,
- hipergammaglobulinemia,
- obniżenie syntezy cytokin (IL-2; IF-1),
- supresja blastogenezy,
- wzrost syntezy przeciwciał antyidiotypowych.

Skorelowanie wyników badań z przetoczeniem krwi można skojarzyć z obrazem klinicznym [40]. Klinicznie efekt immunomodulacyjny wyraża się: zwiększoną liczbą zakażeń po zabiegach chirurgicznych, zwiększonym ryzykiem wznowy i rozsiewu nowotworu u chorych onkologicznych, uaktywnieniem latentnych wirusów, w konsekwencji pogorszeniem rokowania.

Istotny wpływ na immunomodulację ma także mikrochimeryzm, czyli przeżycie komórek dawcy u biorcy krwi. Mikrochimeryzm poprzetoczeniowy (ang. *transfusion associated microchimerism*, TA-MC) jest powszechnie spotykaną, ale niedawno rozpoznaną reakcją poprzetoczeniową [41]. TA-MC jest obecny u około połowy chorych, którym przetoczono krew z powodu maszynowego krwawienia po urazach. U około 10% tych chorych chimeryzm związany był zwykle z jednym dawcą. Utrzymuje się kilka tygodni lub lat powoli narastając i może stanowić 2-5% krążących leukocytów [41]. Warto zauważyć, że mikrochimeryzm poprzetoczeniowy wykrywano również po przetoczeniu ubogoleukocytarnych składników krwi [42].

## Diagnostyka laboratoryjna

Chimeryzm poprzetoczeniowy jest zjawiskiem współistnienia w organizmie komórek o dwóch różnych genotypach. W celu odróżnienia komórek dawcy od komórek biorcy wykorzystywany jest polimorfizm mikrosatelitarny czyli polimorfizm krótkich tandemowych powtórzeń fragmentów DNA (ang. *short tandem repeats*, STR) poddanych amplifikacji w metodzie PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Sekwencje mikrosatelitarne stanowią polimorficzne *loci* zawierające od 10 do 50 powtórzeń krótkiego fragmentu DNA składającego się z 1 do 6 par zasad. Długość sekwencji STR w danym *locus* jest zależna od liczby powtórzeń danego fragmentu DNA, wskutek czego możliwa staje się identyfikacja poszczególnych genotypów. Wysoka różnorodność sekwencji STR (polimorfizm) pozwala na analizę wyznakowanych fluorescencyjnie produktów reakcji PCR w automatycznym sekwenatorze DNA przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Opisana wyżej metoda określana jest terminem fluorescencyjnej STR-PCR [41]. Obecnie istnieje możliwość przeprowadzenia jednej reakcji PCR z wieloma starterami charakterystycznymi dla różnych miejsc polimorficznych (multiplex PCR). Taka reakcja

zwiększa szansę znalezienia tzw. markera informatywnego dla danej pary dawca – biorca. Jest to różnica polimorficzna pomiędzy genomem dawcy i biorcy.

Metodą, która na przestrzeni ostatnich kilku lat znalazła uznanie w badaniu chimeryzmu komórkowego jest *Real Time* PCR czyli PCR w czasie rzeczywistym. Wykrywa ona polimorfizm substytucyjny (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) lub polimorfizm typu insercja/delecja oraz delecja. Metoda ta jest szybsza i czulsza od STR-PCR jednak wadą jej jest trudność w znalezieniu markera odróżniającego dawcę od biorcy [41].

## Literatura

- [1] Davenport R.D.: Haemolytic Transfusion Reactions. W: Popovsky M.: Transfusion Reactions, AABB Press Bethesda, Maryland, 2007; 1-56
- [2] Rowley M., Cantwell C., Milkins C.: Laboratory aspects of blood transfusion. W: Dacie; Levis: Practical Haematology. 11th Ed., Elsevier, 2012; 519-547
- [3] Stainsby D., Jones H., Asher D. i wsp.: Serious hazards of transfusion: A decade of haemovigilance in the UK. *Transfus. Med. Rev.*, 2006; 20: 273-282
- [4] Goodnough L.T.: Current issues in transfusion medicine. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2005; 3: 614-616
- [5] Davenport R.D.: Haemolytic Transfusion Reactions. W: Simon T.L., Snyder E.L., Solheim B.G. i wsp.: Rossi's Principles of Transfusion Medicine. AABB Press, Wiley-Blackwell, 2009; 811-825
- [6] Ambruso D.R.: Haemolytic Transfusion Reactions. Acute W: Hillyer CD., Silberstein LE., Ness PM., Anderson KC.: Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007; 391-400
- [7] Klein H.G., Anstee D.J.: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11th ed., Blackwell Publishing, 2005; 317-389
- [8] Joseph K., Kaplan A.P., Frederich W.A.: Formation of bradykinin: A major contributor to the innate inflammatory response. *Adv. Immunol.*, 2005; 86: 159-208
- [9] Alvarez A., Rives S., Montoto S. i wsp.: Relative sensitivity of direct antiglobulin test, antibody elution and flow cytometry in the serologic diagnosis of immune haemolytic transfusion reactions. *Haematologica*, 2000; 85: 186-188
- [10] Shirey R.S., King K.E., Ness P.M.: Hemolytic Transfusion Reactions. Delayed. W: Hillyer CD., Silberstein LE., Ness PM., Anderson KC.: Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007; 391-400
- [11] Benson K., Agosti S.J., Latoni-Benedetti G.E., Leparac G.E.: Acute and delayed hemolytic transfusion reactions secondary to HLA alloimmunization. *Transfusion*, 2003; 43: 753-757
- [12] Łętowska M., Żupańska B.: Powikłania po leczeniu krwii i jej składnikami. W: Korsak J., Łętowska M. (red): *Transfuzjologia kliniczna*  $\alpha$ -medica press 2009; 204-222
- [13] Davenport R.D.: Management of Transfusion Reactions. W: Mintz P.D. (red): *Transfusion Therapy: Clinical Principles and Practice*, 3rd ed. Bethesda, AABB Press, 2011; 757-784
- [14] Pomper G.J.: Febrile Allergic and Nonimmune Transfusion Reactions. W: Simon T.L., Snyder E.L., Sdheim B.G. i wsp.: Rossi's Principles of Transfusion Medicine. AABB Press, Wiley-Blackwell, 2009; 826-846

- [15] Geiger T.L., Howard S.C.: Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: Good prophylaxis or bad practice? *Transfus. Med. Rev.*, 2007; 21: 1-12
- [16] Addas-Carvalho M., Salles T.S., Saad S.T.: The association of cytokine gene polymorphisms with febrile non haemolytic transfusion reaction in multitransfused patients. *Transfus. Med.*, 2006; 16: 184-191
- [17] Toy P., Gajic O., Bacchetti P. i wsp.: Transfusion related acute lung injury: incidence and risk factors. *Blood*, 2012; 119: 1757-1767
- [18] Sayah D.M., Looney M.R., Toy P.: Transfusion Reactions Newer Concepts on the Pathophysiology, Incidence, Treatment, and Prevention of Transfusion – Related Acute Lung Injury. *Crit. Care Clin.*, 2012; 28: 363-372
- [19] Strait R.T., Hicks W., Barasa N. i wsp.: MHC class I-specific antibody binding to non-hematopoietic cells drives, complement activation to induce transfusion – related acute lung injury in mice. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 2525-2544
- [20] Vlaar A.P., Hofstra J.J., Determann R.M. i wsp.: The incidence risk factors, and outcome of transfusion – related acute lung injury in a cohort of cardiac surgery patients: a prospective nested case – control study. *Blood*, 2011; 117: 4218-4225
- [21] Silliman C.C., Moore E.E., Kelher M.R. i wsp.: Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury. *Transfusion*, 2011; 51: 2549-2554
- [22] Triulzi D.J., Kleinman S., Kakaiya R.M. i wsp.: The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion*, 2009; 49: 1825-1835
- [23] Nikacin A., Cherikh W., Nelson K. i wsp.: Organ procurement and transplantation network/united network for organ sharing histocompatibility committee collaborative study to evaluate prediction of crossmatch results in highly sensitized patients. *Transplantation*, 2009; 87: 557-562
- [24] Zielińska H., Moszkowska G., Dębska-Ślizień A. i wsp.: Możliwości diagnostyczne oceny ryzyka immunologicznego biorcy nerki przed przeszczepieniem i po jego wykonaniu. *Forum Nefrologiczne*, 2011; 4: 320-330
- [25] Roush K.S.: Febrile, Allergic, and Other Noninfections Transfusion Reactions. W: Hillyer C.D., Silberstein L.E., Ness P.M., Anderson K.C.: *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic principles and Practice*: Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007: 401-411
- [26] Vassallo R.R.: Review: IgA anaphylactic transfusion reactions. Part 1. Laboratory diagnosis, incidence, and supply of IgA – deficient products. *Immunohematol.*, 2004; 20:226-233
- [27] Vamvakas E.C.: Allergic and anaphylactic reactions. W: Popovsky M.A. (red) *Transfusion reactions* 3 wyd. Bethesda, AABB Press, 2007: 105-56
- [28] Sandler S.G.: How I manage patients suspected of having had on IgA anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*, 2006; 46: 10-13
- [29] Matsuyama N., Hirayama F., Wakamoto S. i wsp.: Application of the basophil activation test in the analysis of allergic transfusion reactions. *Transfus. Med.*, 2009; 19: 274-277
- [30] Salama A., Schwind P., Schonhage K. i wsp.: Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules by using the particle gel immunoassay: *Vox Sang.*, 2001; 81:

18. Diagnostyka laboratoryjna niepożądanych ...

45-48

- [31] Serious Hazards of Transfusion (SHOT) scheme. SHOT reports and summaries (1996-2009). Manchester, VK: SHOT 2010
- [32] McFarland J.G.: Posttransfusion Purpura. W: Popovsky M.A. (red): Transfusion Reactions. 3 wyd. Bethesda, AABB Press, 2007; 275-300
- [33] Łętowska M., Maślanka K.: Kliniczne aspekty przetaczania koncentratów krwinek płytkowych. W: Korsak J., Łętowska M. (red): Transfuzjologia kliniczna.  $\alpha$ -medica press 2009; 101-122
- [34] Agbaht K., Altintas ND., Topeli A. i wsp.: Transfusion-associated graft – versus-host disease in immunocompatent patients: Case series and review of the literature. Transfusion, 2007; 47: 1405-1411
- [35] Serefhanoglon K., Turan H., Saba T. i wsp.: Transfusion-associated graft – versus-host disease in an immunocompatent individual following cardiac surgery: J. Natl. Med. Assoc., 2005; 97: 418-420
- [36] Oto O.A., Paydas S., Baslamisli F. i wsp.: Transfusion – associated graft – versus-host disease. Eur. J. Intern. Med., 2006; 17: 151-156
- [37] Ferrara J.L., Levine J.E., Reddy P., Holler E.: Graft versus-host disease. Lancet, 2009; 373: 1550-1561
- [38] Rühl H., Bein G., Sachs U.J.: Transfusion- associated graft – versus-host disease. Transfus. Rev., 2009; 23: 62-71
- [39] Sage D., Stanworth S., Turner D., Navarrete C.: Diagnosis of transfusion - associated graft-vs.-host disease. The importance of short tandem repeat analysis. Transfus. Med., 2005; 15: 481-485
- [40] Vamvakas E.C., Bordin J.O., Blajchman M.A.: Immunomodulatory and Proinflammatory Effects of Allogeneic Blood Transfusion. W: Simon T.I., Snyder E.L., Solheim C.P., i wsp. (red): Rossi's Principles of Transfusion Medicine. IV wyd. Blackwell Publishing, 2009; 699-717
- [41] Reed W., Lee T.H., Norris P.J. i wsp.: Transfusion-Associated Microchimerism: A New Complication of Blood Transfusion in severely Injured Patients. Semin. Hematol., 2007; 44: 24-31
- [42] Dawidowska M., Wachowiak J.: Rozwój badań molekularnych w hematologii – monitorowanie minimalnej choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej i potransplantacyjnego chimeryzmu hematopoetycznego. Nowiny Lek., 2007; 73: 282-291

# ZNACZENIE STANDARYZACJI BADAŃ GENETYCZNYCH: MIĘDZYLABORATORYJNY TEST KONTROLI JAKOŚCI BADAŃ FISH W HEMATOONKOLOGII

Barbara Pieńkowska-Grela, Beata Grygalewicz

*Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii -  
Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa*

## Streszczenie

Ze względu na rosnące znaczenie i coraz szersze stosowanie w Polsce technik cytogenetycznych i molekularnych w diagnostyce chorób hematoonkologicznych, istnieje konieczność standaryzacji badań genetycznych i wypracowania procedur w zakresie kontroli jakości tych badań. Dla zapewnienia właściwej jakości procedur badawczych laboratoria powinny stosować systemy wewnętrznej i zewnętrznej kontroli jakości. Jednym z zalecanych narzędzi walidacji jakości pracy laboratorium jest udział w programach zewnętrznej kontroli jakości, bądź programach porównań międzylaboratoryjnych. Metoda prób kontrolnych jest podstawowym sposobem oceny precyzji i poprawności w diagnostyce laboratoryjnej. Udział w badaniu pozwala na ocenę zdolności laboratorium do przeprowadzania określonego typu oznaczeń. Sprawdzianowi takiemu poddają się w Polsce laboratoria zrzeszone w Sekcji Cytogenetyki Hematoonkologicznej, Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka. Test sprawdza kompetencje laboratorium w zakresie technik fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przy użyciu komercyjnych sond DNA. Laboratoria biorące udział w teście otrzymują ocenę nadesłanych wyników oraz świadectwo uczestnictwa. Konsekwentnie prowadzony program porównań międzylaboratoryjnych może pomóc w podnoszeniu jakości badań wykonywanych w laboratoriach diagnostycznych, jest dobrym narzędziem edukacyjnym, może też mieć skutki opiniotwórcze. W chwili obecnej wydaje się jednak, że dla zapewnienia rzeczywistej i egzekwowalnej kontroli jakości pracy laboratoriów diagnostycznych niezbędne jest zaangażowanie instytucji, która będzie mieć uprawnienia do weryfikacji uprawnień diagnostycznych kontrolowanych jednostek.

*Słowa kluczowe:* diagnostyka, hematoonkologia, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, standaryzacja

## 19.1. Rola badań genetycznych w diagnostyce hematoonkologicznej

W komórkach określonych nowotworów obecne są specyficzne zaburzenia genetyczne. Modyfikacja aktywności genów, głównie w wyniku aktywacji onkogenów, inaktywacji genów supresorowych czy fuzji genowych, ma związek z cechami klinicznymi choroby [1]. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *The World Health Organization*, WHO) wskazuje zmiany genetyczne jako jedną z najważniejszych cech, pozwalających na klasyfikację poszczególnych nowotworów, szczególnie białaczek i chłoniaków [2].

Istotna część powtarzalnych aberracji genetycznych pełni rolę kryterium diagnostycznego lub wskaźnika rokowniczego. Takie zmiany, wykrywane w badaniu cytogenetycznym nie tylko umożliwiają rozpoznanie, ale mogą też stanowić o stratyfikacji pacjentów do określonych grup ryzyka i zastosowania odpowiedniego leczenia (Tabela 13.1). Ze względu na rosnącą rolę diagnostyki genetycznej w podejmowaniu decyzji terapeutycznych, coraz ważniejsze staje się stworzenie warunków zapewniających wysoka jakość wykonywanych oznaczeń. Kompetencje genetycznych laboratoriów diagnostycznych powinny opierać się na szerokiej wiedzy i doświadczeniu diagnostów, a nie mniej ważne jest skrupulatne przestrzeganie właściwych procedur i standardów diagnostycznych.

## 19.2. Podstawowe techniki badań cytogenetycznych: możliwości i ograniczenia

Przedstawione w Tabeli 13.1 zaburzenia materiału genetycznego komórek nowotworowych można wykryć metodami analizy kariotypu i/lub fluorescencyjnej hybrydyzacja *in situ* (FISH). Analiza kariotypu ujawnia nieprawidłowości morfologii chromosomów komórek w stadium metafazy (Tabela 13.1A), jednak część przedstawionych aberracji jest na granicy lub poniżej poziomu detekcji tej metody (Tabela 13.1B).

Kariotyp określa się na podstawie analizy chromosomów metafazowych, barwionych różnicowo. Do sformułowania wiarygodnego wyniku upoważnia pełna analiza odpowiedniej liczby metafaz (optymalnie 30). Zmianę uznaje się za klonalną (nielosową) w przypadku wystąpienia co najmniej dwu komórek z tą samą aberracją strukturalną bądź dodatkowym chromosomem. Utraty pojedynczych kopii chromosomów (monosomie) uważa się za klonalne w przypadku co najmniej trzech powtórzeń. Istotne znaczenie dla dokładności analizy ma uzyskany poziom rozdzielczości prążkowej. Minimalny standard, 400 prążków w zestawie haploidalnym, wystarcza do rozpoznania aneuploidii i dużych, spodziewanych aberracji strukturalnych. Mniejsze i nietypowe aberracje strukturalne można odpowiedzialnie wykazać przy lepszej jakości obrazu, w obecności ponad 550 prążków. Zasadniczo, w badaniu kariotypowym można wykryć zaburzenia, przy których przemieszczony materiał jest nie mniejszy niż kilka milionów par zasad (minimum 1- 5 Mpz DNA). Wyższą rozdzielczość uzyskać można metodami cytogenetyki molekularnej.

19.2. Podstawowe techniki badań cytogenetycznych: możliwości i ograniczenia

Tabela 19.1: Typowe aberracje chromosomowe w wybranych białaczkach.

Aberracja	Nowotwór	Znaczenie kliniczne
A. Aberracje rutynowo wykrywane metodą kariotypowania (uzupełniające: FISH, PCR)		
t(9;22)(q34;q11) <i>fuzja BCR/ABL</i>	Przewlekła białaczka szpikowa	diagnostyczne, wskazanie do leczenia inhibitorami kinaz
Brak metafaz z t(9;22)	Przewlekła białaczka szpikowa w trakcie leczenia	całkowita remisja cytogenetyczna
1-35% metafaz z t(9;22)		częściowa remisja cytogenetyczna
36-65% metafaz z t(9;22)		mniejsza remisja cytogenetyczna
66-95% metafaz z t(9;22)		minimalna remisja cytogenetyczna
>95% metafaz z t(9;22)		czynnik złego rokowania, wskazanie do leczenia inhibitorami kinaz
t(9;22)(q34;q11) <i>fuzja BCR/ABL</i>	Ostra białaczka limfoblastyczna	czynnik złego rokowania, wskazanie do leczenia inhibitorami kinaz
t(15;17)(q22;q12) <i>fuzja PML/RARA</i>	Ostra białaczka szpikowa z t(15;17)	diagnostyczne, dobre rokowanie, wskazanie do leczenia ATRA
B. Aberracje rutynowo wykrywane metodą FISH		
del(17)(p13)* <i>utrata TP53</i> >20% populacji kom.	Przewlekła białaczka limfatyczna	czynnik złego rokowania
del(11)(q22)* <i>utrata ATM</i> >20% populacji kom.		czynnik złego rokowania
del(13)* <i>bez utraty RB1</i>		dobre rokowanie, jeśli to zmiana izolowana
del(17p)* utrata <i>TP53</i>	Szpiczak plazmocytowy**	silny czynnik złego rokowania
(14;16)(q32;q23)* <i>IGH/MAFC</i>		czynnik złego rokowania
t(14;20)(q32;q11)* <i>IGH/MAFB</i>		czynnik złego rokowania
t(4;14)(p16;q32)* <i>fuzja FGFR3/MMSET</i>		rokowanie pośrednie

# na podstawie [1–7, 10]

\* aberracja niewidoczna (lub trudna do uchwycenia) w badaniu kariotypowym

\*\* badanie w populacji komórek plazmatycznych (sIG-FISH)

Technika FISH pozwala na analizę metafaz i jąder interfazowych dla detekcji ilościowych (delecje, powielenia) bądź strukturalnych (fuzje, rearanżacje) aberracji, dotyczących określonego obszaru DNA znakowanego przez sondę molekularną (od ok. 100 kbp) [8]. Uzyskany obraz uwidacznia liczbę, położenie i wzajemne relacje znakowanych genów. W sytuacjach typowych uzyskane wyniki pozwalają w sposób jednoznaczny zdefiniować obecność bądź brak poszukiwanego zaburzenia genetycznego (np. utrata genu czy fuzja genów). Ocena jest obwaro-



wana licznymi wskazaniami (granica błędu zależna m.in. od typu użytej sondy czy rodzaju nowotworu; zalecana liczba analizowanych komórek w zależności od rodzaju zmiany itp.). Zaawansowane techniki, takie jak siG-FISH, pozwalają na analizę aberracji w wyodrębnionej populacji komórek np. w populacji plazmacytów w przypadku szpiczaka [9, 10].

Wynik badania FISH dotyczy jedynie obszarów komplementarnych do użytej sondy DNA. W wielu przypadkach niezbędne jest więc zastosowanie kilku sond DNA lub/i równoległa analiza kariotypowa. Wynik badania FISH jest zwykle jednoznaczny, jednak interpretacja nietypowego obrazu może stanowić wyzwanie dla mniej wprawnego diagnosty, stąd potrzeba konsultacji między laboratoriami o podobnym profilu.

### **19.3. Standaryzacja badań w cytogenetyce nowotworów**

Wprowadzanie systemów jakości jest niezbędne dla ujednoczenia standardów badań cytogenetycznych. Europejskie Towarzystwo Cytogenetyczne publikuje takie zalecenia (*E.C.A. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance*), dotyczące zarówno obszaru genetyki klinicznej jak i badań na materiale nowotworowym [12]. W Polsce wymagania wobec laboratoriów cytogenetyki hematologicznej precyzuje Ustawa o diagnostyce laboratoryjnej i rozporządzenia Ministra Zdrowia [13, 14]. Regulują one warunki wykonywania czynności laboratoryjnych, nakładając na laboratoria konieczność opracowania i przestrzegania procedur zlecenia badań, pobierania, transportu i przyjmowania materiału do badań oraz metod badawczych. Określone są też standardy pomieszczeń i urządzeń laboratorium, a także wymagania fachowe wobec personelu i kierownictwa.

Sekcja Cytogenetyki Hematoonkologicznej Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka zrzesza laboratoria, pracujące w obszarze cytogenetyki nowotworów. Jednym z ważniejszych celów Sekcji jest propagowanie wysokiego standardu jakości badań diagnostycznych, w tym określenie najważniejszych obszarów kontroli. Podjęte działania, zaowocowały wydaniem poradnika „Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematoonkologicznych”, który przedstawia zalecane procedury [15]. W ramach Sekcji przygotowano projekt sprawdzianów kontroli jakości w cytogenetycznych badaniach hematoonkologicznych, realizowany obecnie dla stworzenia polskiej grupy referencyjnych laboratoriów diagnostycznych (szerszy opis na stronie PTGC) [16].

### **19.4. Międzylaboratoryjny Test Kontroli Jakości Badań FISH w Hematoonkologii**

Jednym z zalecanych narzędzi walidacji jakości pracy diagnostycznej jest udział w programach porównań międzylaboratoryjnych. Metoda prób kontrolnych polega na ocenie wyników badań wykonanych przez grupę laboratoriów na tej samej próbce. Udział w takim badaniu pozwala na ocenę zdolności laboratorium do przeprowadzania określonego typu badań. Komisja Standaryzacji Sekcji Cytogenetyki Hematoonkologicznej od 2008 roku organizuje Międzylaborato-

ryjny Test Kontroli Jakości Badań FISH. Celem testu jest zarówno poprawa jakości badań i zwiększenie ich użyteczności klinicznej, jak też edukacja osób wykonujących badania oraz weryfikacja wiarygodności uzyskiwanych w laboratoriach wyników. Sprawdzian umożliwi porównawczą ocenę poszczególnych laboratoriów, jednak ze względu na zrozumiałą tendencję do szczególnie uważnego traktowania materiału testowego, ocena taka nie odzwierciedla w pełni jakości badań rutynowych.

Pilotowa, pierwsza edycja Testu FISH spotkała się z dużym zainteresowaniem cytogenetyków. Powszechny udział laboratoriów i przychylne oceny upewniły organizatorów, że kontynuacja tego projektu uzyskała poparcie środowiska (Tabela 19.2).

Tabela 19.2: Zestawienie dotychczasowych edycji Testu FISH.

Edycja Testu	Próbka 1	Próbka 2	Liczba laboratoriów*
I	Podejrzenie CML	Chimeryzm X/Y po przeszczepie	18
II	Monitorowanie CML	Diagnostyka Zespołu 5q-	19
III	Podejrzenie CML	Podejrzenie trisomii 8 w MDS	19
IV	Podejrzenie CML	Przewlekła białaczka limfaticzna -ocena przed leczeniem	21

\* nie zawsze są to te same laboratoria

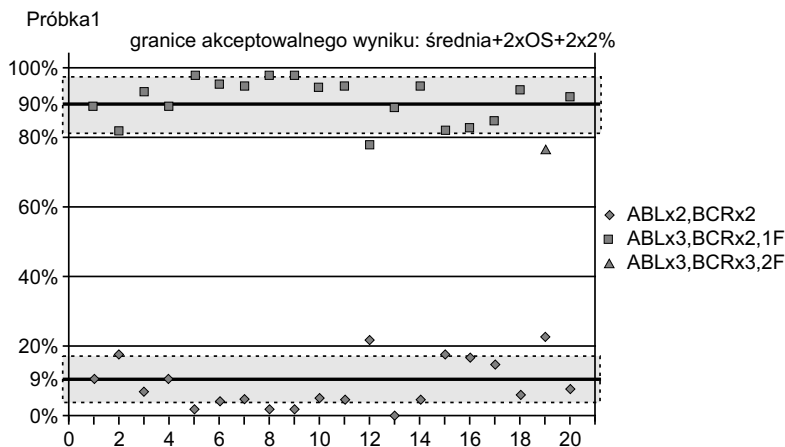
### 19.4.1. Przebieg Testu

Udział w Teście jest dobrowolny i bezpłatny. Organizatorzy zapewniają dostarczenie utrwalonej zawiesiny komórek, będącej równocześnie zdiagnozowaną próbką kliniczną. Jednorazowo testowane są dwie próbki. Jedna - w kierunku oceny obecności fuzji *BCR/ABL1*, druga dla oceny statusu innego obszaru, istotnego w diagnostyce chorób rozrostowych. Nadesłane wyniki są oceniane przez ekspertów (2-3 osoby, specjaliści z uznanych polskich laboratoriów). Ocenie podlegają: prawidłowy dobór sond, jakość/czytelność uzyskanego znakowania; prawidłowość uzyskanego wyniku; zgodność zapisu z ISCN, opis wyniku i jego interpretacja.

W trakcie dotychczasowych edycji Testu dobór sond do badania i jakość uzyskiwanego znakowania (poza incydentalnymi błędami) były w uczestniczących laboratoriach dobra i bardzo dobra. Prawidłowość uzyskanego wyniku oceniana jest dwustopniowo, pod kątem: 1) detekcji badanej aberracji (np. obecności/brak fuzji genowej), 2) wartości odsetkowej komórek z badaną aberracją, wobec wartości średniej, wyznaczonej na podstawie wszystkich uzyskanych wyników (+/- odchylenie standardowe (OS), +/- granica błędu) (Rycina 19.1).

Na podstawie zestawienia uzyskiwanych wyników można oceniać, że kompetencje laboratoriów w zakresie podstawowego panelu badań FISH są generalnie dość dobre. W zakresie diagnostyki CML tylko raz jedno z laboratoriów nie roz-

## 19. Znaczenie standaryzacji badań genetycznych ...



Rycina 19.1: Ocena odsetka komórek z fuzją *BCR/ABL* w badanej próbce w poszczególnych laboratoriach. Wyznaczona wartość prawidłowa: 90% komórek z fuzją *BCR/ABL* z jednym sygnałem fuzyjnym (*ABLx3,BCRx2,1F*), 9% komórek bez fuzji *BCR/ABL* (*ABLx2,BCRx2*).

poznało obecności fuzji *BCR/ABL*, w kolejnych edycjach testu ten błąd już się nie powtórzył. Niestety, ocena wartości odsetkowej komórek z badaną cechą i ocena rzadszych wariantów w części placówek wymaga poprawy.

Nadsyłane formularze wyników w większości zgodne są z obowiązującymi zasadami i zawierają wymagane punkty, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami [14]. Najczęściej popełniane błędy obejmują niepoprawny zapis aberracji (ISCN). Niestety, część laboratoriów nie radzi sobie w sposób właściwy z interpretacją uzyskanych wyników, szczególnie w kontekście klinicznym. Te ostatnie błędy dotyczą najczęściej analizy rzadszych jednostek klinicznych czy rzadziej oznaczanych zaburzeń genetycznych. Fakt ten wskazuje to na konieczność stałej aktualizacji wiedzy diagnostów, a także podkreśla potrzebę wyodrębnienia laboratoriów referencyjnych.

Poszczególne punkty oceny są szczegółowo dyskutowane na Roboczym Spotkaniu uczestników. Wykłady i dyskusje dotyczą wielu aspektów działalności laboratoriów w tym szczegółowych procedur laboratoryjnych i kontroli jakości, w świetle obowiązujących przepisów i ich praktycznego zastosowania. Laboratoria otrzymują szczegółowy opis popełnionych błędów i wersję poprawną (zalecaną) oraz Świadczenie Uczestnictwa.

### 19.4.2. Laboratoria uczestniczące w programie

Dzięki danym, zebranych za pośrednictwem ankiet przeprowadzanych przez organizatorów Testu, można pokusić się ocenę strony organizacyjno-technicznej laboratoriów uczestniczących w programie. Większość laboratoriów spełniania wymogi formalne Rozporządzenia Ministra Zdrowia i wytyczne *E.C.A.* [12–14]. Przeważają laboratoria legitymujące się z długim, ponad 10-letnim doświadczeniem diagnostycznym, a najnowsze z placówek biorących udział w Teście działają

ponad 2 lata. Wszystkie ankietowane laboratoria są członkami Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) i zatrudniają co najmniej jedną osobę z uprawnieniami diagnosty laboratoryjnego. Zdecydowana większość placówek zatrudnia specjalistów z zakresu laboratoryjnej genetyki medycznej. Wszystkie z ankietowanych laboratoriów są wyposażone w sprzęt i oprogramowanie umożliwiające rutynową diagnostykę FISH. Liczba zatrudnionych to średnio 7 osób (od 1 do 20). Dostateczną dla utrzymania biegłości oznaczenia liczbę oznaczeń ( $\geq 200$  rocznie) wykonuje 14 jednostek (wartość ustalona na potrzeby Testu). Liczba badań zwykle przewyższa liczbę diagnozowanych pacjentów, co świadczy o wykonywaniu (przynajmniej u części z nich) kompleksowej diagnostyki genetycznej.

W prawie wszystkich laboratoriach analizy techniką FISH towarzyszą badaniom cytogenetyki klasycznej. Wykonanie równoległych badań Kariotyp/FISH na tym samym materiale klinicznym jest często kluczowe dla potwierdzenia i interpretacji wykrytych zmian.

Niezbyt imponująco wygląda kwestia certyfikacji placówek. Niespełna 30% laboratoriów (lub ich instytucji macierzystych) wykazuje certyfikację ISO, natomiast żadne z laboratoriów nie ma akredytacji PCA (stan na rok 2011).

## 19.5. Podsumowanie

Postęp wiedzy w zakresie genetycznego podłoża procesu nowotworowego spowodował, że w ostatnim dziesięcioleciu diagnostyka genetyczna stała się nieodzownym składnikiem hematologii praktycznej. W oddziałach hematologicznych zlecenie badania cytogenetycznego stało się, w określonych sytuacjach klinicznych, czynnością rutynową. Istnieje jednak obawa, że przy braku instytucjonalnej kontroli placówek oferujących wykonanie badań, rosnący popyt na tego rodzaju usługi może, poprzez mechanizmy rynkowe, wpłynąć negatywnie na jakość badań, dostępnych na rynku usług medycznych. W tej sytuacji zachodzi konieczność wypracowania instytucjonalnych procedur w zakresie kontroli jakości tych badań w Polsce. Równie ważna jest działalność edukacyjna w zakresie doskonalenia technicznego, przestrzegania procedur kontroli wewnętrznej laboratorium, fachowości i rzetelności diagnostów, a także ustawicznego kształcenia specjalistów biorących udział w procesie diagnostycznym. Ścisłe przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, ustawowych zaleceń, a także wskazań ekspertów może przynieść wymierną poprawę jakości dostępnych badań cytogenetycznych, a co za tym idzie korzyści dla pacjentów.

## Literatura

- [1] Mitelman F. Database of Chromosome Aberrations in Cancer, The Cancer Genome Anatomy Project <http://cgap.nih.gov/chromosomes/Mitelman>. Accessed July 14, 2012
- [2] Sverdlov S.H., Campo E., Harris N.L. i wsp. (red.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, 2008
- [3] Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960;132: 1497

## 19. Znaczenie standaryzacji badań genetycznych ...

- [4] Rowley J.D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 1998;32:495-519
- [5] Heisterkamp N., Groffen J. Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol.* 1991; 5 (1): 1-10
- [6] Recommendations from the European LeukemiaNet for the Management of chronic myeloid leukemia (CML). Update 2010. [http://www.eutos.org/content/home/news/download\\_material/e1023/infoboxContent1024/PocketCard\\_2010\\_final.pdf](http://www.eutos.org/content/home/news/download_material/e1023/infoboxContent1024/PocketCard_2010_final.pdf)
- [7] Heerema N.A., Harbott J., Galimberti S. i wsp.: Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. *Leukemia*, 2004;18: 693-702,
- [8] Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1986; 83:2934-2938
- [9] Christensen J.H., Abildgaard N., Plesner T. i wsp. Interphase fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance without and with positive plasma cell identification: analysis of 192 cases from the Region of Southern Denmark. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 174: 89-99
- [10] Kumar S.K., Mikhael J.R., Buadi F.K. i wsp. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc.* 2009; 84: 1095-1110
- [11] Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. (red.); ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel 2009
- [12] E.C.A. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance, Update Jan. 2012 [http://e-c-a.eu/files/downloads/E.C.A.\\_General\\_Guidelines\\_Version%202.0.pdf](http://e-c-a.eu/files/downloads/E.C.A._General_Guidelines_Version%202.0.pdf)
- [13] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3.03.2004 r. w sprawie wymagań jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne. Dz.U.04.43. 408
- [14] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U.06.61.435. z późniejszymi zmianami)
- [15] Pieńkowska-Grela B. (red.). Analiza cytogenetyczna w nowotworach hematologicznych. Poradnik. Sekcja Cytogenetyki Hematoonkologicznej PTGC, Warszawa 2004
- [16] Projekt Organizacji Referencyjnych Laboratoriów Diagnostycznych Cytogenetyki Hematoonkologicznej, Dostęp: lipiec 2012, <http://www.ptgc-med.pl/>

# ZNACZENIE STANDARYZACJI BADAŃ IMMUNOGENETYCZNYCH: WARSZTATY KONTROLI JAKOŚCI TYPOWANIA HLA

Katarzyna Bogunia-Kubik

*Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu*

## Streszczenie

Wyniki badań immunogenetycznych, w tym oznaczania specyficzności antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej (HLA), mają istotne znaczenie w klinice człowieka. Powinny wykonywać je osoby kompetentne i odpowiednio do tego przygotowane, postępujące zgodnie z ustaloną procedurą. Dlatego też zainicjowany w 1999 roku przez Profesora Andrzeja Lange program standaryzacji typowania HLA w Polsce znalazł szeroki odzew nie tylko ze strony pracowni HLA w naszym kraju, ale i poza jego granicami. W sumie od 1999 do 2012 roku w Warsztatach Typowania HLA dla Krajów Europy Środkowej i Wschodniej udział wzięło 55 laboratoriów z 13 krajów (Bułgarii, Chorwacji, Czech, Estonii, Litwy, Łotwy, Polski, Rosji, Rumunii, Słowacji, Serbii, Turcji i Węgier).

W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione główne zalecenia Polskiego Towarzystwa Immunogenetycznego dotyczące organizacji laboratoriów immunogenetycznych. Ponadto omówione zostaną podstawowe zasady organizacji Warsztatów Kontroli Jakości Typowania HLA wraz z korzyściami płynącymi z uczestnictwa w warsztatach.

*Słowa kluczowe:* badania immunogenetyczne, typowanie HLA, kontrola jakości, standaryzacja

### 20.1. Znaczenie typowania HLA w klinice człowieka

Typowanie antygenów zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigens*, HLA) ma istotne znaczenie w transplantologii. Antygeny zgodności tkankowej są oznaczane u chorych oczekujących na przeszczep narządu(ów) oraz osób zdrowych, zarejestrowanych jako potencjalni dawcy szpiku i/lub krwi. Typowanie HLA przeprowadzane jest również dla komórek bankowanej krwi pępowinowej, będącej, obok szpiku kostnego, źródłem materiału do przeszczepu komórek

krwiotwórczych. Specyficzności HLA są oznaczane w celu potwierdzenia genetycznej zgodności pary dawca biorca alogenicznego przeszczepu narządów unaczynionych i komórek krwiotwórczych. W przypadku doboru dawcy narządów unaczynionych, np. nerek, typowane są antygeny HLA klasy I i II (antygeny *locus* HLA-DR mają najistotniejsze znaczenie) na tzn. niższym poziomie rozdzielczości. Podobne oznaczenia wykonywane są dla doboru rodzinnego dawcy komórek krwiotwórczych. W przypadku braku zgodnego dawcy rodzinnego i konieczności poszukiwania alternatywnego dawcy (haplotypowo-zgodnego członka rodziny lub dawcy niespokrewnionego) typowanie wykonywane jest na wyższym stopniu rozdzielczości i oznaczane są allele poszczególnych *loci* klasy I HLA-A, B i C oraz klasy II HLA-DR i DQ [1, 2].

Oznaczanie specyficzności pozostałych *loci* HLA (np. HLA-DP czy nieklasycznych HLA, np. HLA-E) czy też innych genów kodowanych w obrębie 6 chromosomu jest wciąż kwestią otwartą, aczkolwiek wiele badań wskazuje na istotne znaczenie typowania specyficzności spoza 5 klasycznych *loci* HLA (A, B, C, DR, DQ) dla powodzenia alogenicznego przeszczepienia komórek krwiotwórczych (np. [3–7]).

Dla prawidłowego przebiegu potransplantacyjnego ważnym aspektem jest także dobór odpowiedniego dawcy płytek. Koncentraty płytek krwi są podawane chorym po intensywnej chemo- i radioterapii. Wówczas zalecane jest oznaczenie HLA klasy I *locus* A i B. Istotne znaczenie ma również określanie specyficzności HLA w analizie związków z chorobami, ponieważ mogą stanowić jeden z markerów genetycznych związanych z podatnością na chorobę czy też jej przebiegiem.

## 20.2. Konieczność standaryzacji badań immunogenetycznych

Z uwagi na istotne znaczenie typowania HLA w klinice człowieka ważnym jest, aby badanie to wykonywane było przy użyciu pewnej, wiarygodnej, wystandaryzowanej metody oraz, aby osoby wykonujące takie badanie były odpowiednio do tego przygotowane.

Obecnie badanie to przeprowadzane jest przede wszystkim przy użyciu technik biologii molekularnej [9, 10]. Do najczęściej stosowanych metod zalicza się:

- amplifikację z użyciem swoistych sekwencji inicjujących (ang. *sequence specific amplification*, PCR-SSP) polegającą na wykonaniu wielu łańcuchowych reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) dla badań każdego genu HLA i bezpośredniej analizie produktów amplifikacji w żelu agarozowym;
- technikę PCR-SSO (ang. *PCR and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes*) opartą na powieleniu części konserwatywnej analizowanego genu i dalszych analizach amplifikowanej sekwencji za pomocą hybrydyzacji z użyciem swoistych sond oligonukleotydowych;
- oraz SBT (ang. *sequence based typing*) badaną sekwencję genu kodującego HLA analizuje się poprzez jej sekwencjonowanie.

Obok metod genetycznych niektóre laboratoria posługują się również typowaniem serologicznym. W metodzie tej, dzięki zastosowaniu odpowiednich przeciwciał, analizowana jest swoistość ekspresjonowanych na powierzchni komórek cząsteczek HLA. Metoda ta jednak obarczona jest stosunkowo wysokim odsetkiem nieprawidłowych oznaczeń [10] a jej dodatkowe ograniczenia wynikają z braku dostępu odpowiednich surowic do typowania wszystkich opisanych specyficzności HLA [9].

Każde z oznaczeń można poddać weryfikacji. Jednym z podstawowych sposobów, w przypadku dostępności wyników typowania pacjenta i członków jego rodziny, jest przeprowadzenie segregacji haplotypów matczynych i ojcowskich [8, 9]. Ponieważ wiele różnorodnych technik i ich wariantów może być wykorzystywanych do oznaczania HLA (badanie serologiczne czy też metody typowania na poziomie genomowego DNA) liczba personelu musi być wystarczająca do zabezpieczenia różnorodności i liczby wykonywanych oznaczeń. Szeroki wachlarz metodyczny (unowocześniany sprzęt i odczynniki, metody detekcji i analizy wyników), związany z jednej strony z rosnącą liczbą poznawanych allelicznych specyficzności HLA a z postępem technologicznym z drugiej, niesie ze sobą konieczność częstej aktualizacji stosownych metod laboratoryjnych i odpowiedniego przeszkolenia pracowników. Dlatego też obowiązkiem kierownika jest sprawdzanie pracowników odnośnie ich kompetencji oraz umożliwienie im rozwoju i poszerzenia kwalifikacji poprzez udział w odpowiednich warsztatach i szkoleniach.

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Immunogenetycznego każde Laboratorium, którego pracownicy zajmują się typowaniem tkankowym powinno uczestniczyć w programie zewnętrznej kontroli jakości dla wszystkich metod używanych w laboratorium oraz przeprowadzać wewnętrzną kontrolę jakości. Każdy z pracowników laboratorium powinien być poddany takiej wewnętrznej kontroli 4 razy do roku dla sprawdzenia powtarzalności otrzymywanych wyników typowania.

Celem udziału laboratoriów w Warsztatach Kontroli Jakości Typowania HLA jest weryfikacja oznaczeń własnych danego laboratorium poprzez porównanie wyników z wszystkich ośrodków biorących udział w standaryzacji. Zbiorcza analiza wyników pozwala na wyłonienie trudno-oznaczanych specyficzności oraz określenie typu popełnianych błędów, takich jak: oznaczenie dodatkowego antygenu / allelu, pominięcie oznaczenia danej specyficzności, błędne oznaczenie danej specyficzności czy też brak oznaczenia podtypów, alleli. Ponadto równocześnie kontroli podlegają stosowane do badań zestawy odczynników. Wyniki dotychczasowych analiz zwracają uwagę na trudności w serologicznym oznaczeniu podtypu antygenu HLA-A68(28) oraz typowaniu A66(10) czy też B57(17). Z kolei w typowaniu na poziomie DNA najwięcej niezgodności dotyczyło oznaczenia HLA-A\*66 [11].

Korzyścią z udziału w warsztatach standaryzacyjnych jest więc obniżenie ryzyka błędów metodycznych i związane z nim podwyższenie jakości, wiarygodności i odtwarzalności badań. Prowadzi to w konsekwencji do wzrostu zaufania



potencjalnych odbiorców. Równocześnie poprawie ulega efektywność pracy i rośnie satysfakcja zawodowa pracowników (Rycina 20.1).

### 20.3. Standaryzacja badań immunogenetycznych w Polsce

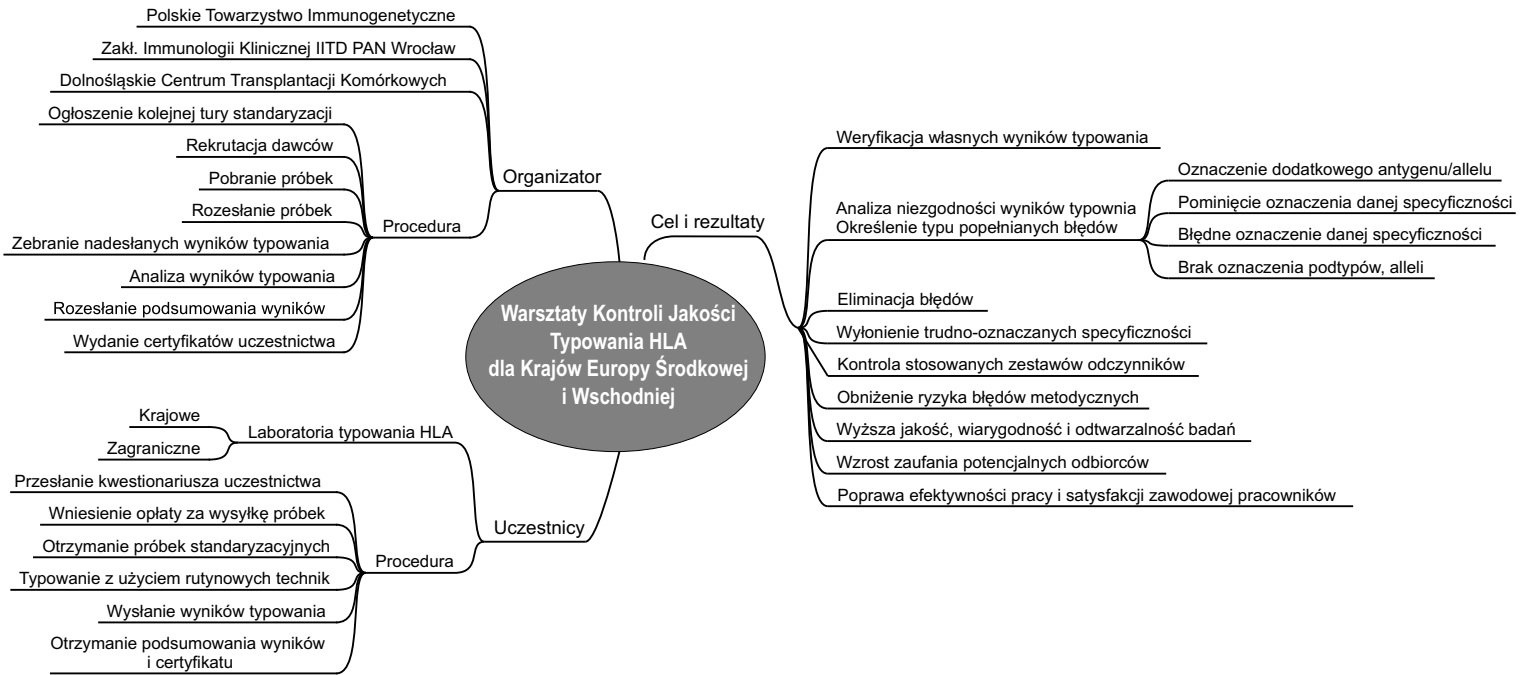
Standaryzacja badań immunogenetycznych w Polsce została zapoczątkowana dzięki inicjatywie Pana Profesora Andrzeja Lange, koordynatora tego przedsięwzięcia. Warsztaty Kontroli Jakości Typowania HLA dla Krajów Europy Środkowej i Wschodniej organizowane są od 1999 roku [12]. W pierwszej turze warsztatów zorganizowanej w 1999 roku udział wzięły tylko placówki polskie, ale rok później dołączyły do uczestników laboratoria zagraniczne [13]. W sumie w latach 1999-2012 w organizowanych przez nas warsztatach wzięło udział 55 placówek z 13 krajów Europy [14–16]. Obok 24 laboratoriów z Polski wśród uczestników znalazły się pracownie z Bułgarii, Chorwacji, Czech, Estonii, Litwy, Łotwy, Rosji, Rumunii, Słowacji, Serbii, Turcji i Węgier.

Obecnie (dane z 2012 roku) 21 polskich laboratoriów typowania tkankowego poddaje się standaryzacji w ramach organizowanych przez Polskie Towarzystwo Immunogenetyczne Warsztatów Kontroli Jakości Typowania HLA.

Zgodnie z wymogami Europejskiej Federacji Immunogenetyki dla organizatorów standaryzacji uczestnicy, po wypełnieniu odpowiedniego zgłoszenia, otrzymują co roku po 10 próbek krwi pobranej na EDTA do typowania na poziomie genomowego DNA i/lub 10 próbek krwi pobranej na heparynę do typowania serologicznego.

W ramach warsztatów standaryzacji podlegają: typowanie serologiczne HLA klasy I *locus* A i B; typowanie genetyczne, zarówno na niskim jak i wysokim poziomie rozdzielczości, HLA klasy I *locus* A, B, C oraz HLA klasy II *locus* DRB1 i DQB1; a od ubiegłego 2011 roku (XVII tury warsztatów) również HLA-DPB1 na wysokim poziomie rozdzielczości [16].

Wyniki są przesyłane do autorki niniejszego opracowania, która gromadzi, segreguje i analizuje przesłane przez uczestników dane, a następnie przesyła podsumowane rezultaty w postaci zbiorczych tabel z zaznaczonymi niezgodnościami typowania do wszystkich uczestników danej kategorii standaryzacji. W kolejnym etapie są przygotowywane i rozsyłane do uczestników certyfikaty potwierdzające ich udział w danej turze warsztatów. Certyfikaty zawierają: (i) informacje o organizatorach i wszystkich uczestnikach danej tury standaryzacji, (ii) informacje o danym laboratorium biorącym udział w warsztatach (imię i nazwisko kierownika / uczestnika (ów), nazwę i adres laboratorium, od kiedy laboratorium uczestniczy w warsztatach), (iii) wyniki typowania dla poszczególnych kategorii standaryzacji w formie liczby bezbłędnie oznaczonych próbek przypadających na liczbę przesłanych do typowania próbek w danej kategorii oraz (iv) informację o tym, czy spełnione zostały kryteria oczekiwanej poprawności typowania (w danej kategorii oznaczeń dopuszczalna jest maksymalnie jedna niezgodność wyników typowania). Certyfikaty przygotowywane są w języku polskim i angielskim, odpowiednio, dla uczestników z Polski i z zagranicy. Certyfikaty nie zawierają wyników serologicznego typowania HLA-C (Rycina 20.2).



Rycina 20.1: Schemat organizacji warsztatów standaryzacyjnych prowadzonych przez Polskie Towarzystwo Immunogenetyczne.

## 20. Znaczenie standaryzacji badań immunogenetycznych...



**Oddział Kontroli Jakości**  
**Polskie Towarzystwo Immunogenetyczne (PTIg)**  
 ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

w oparciu o:



**ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ**  
**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ**  
 im. Ludwika Hirszfelda  
 Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12  
 53-114 Wrocław  
 tel. +48 (71) 3371172  
 fax: +48 (71) 3371382  
 http://www.iitd.pan.wroc.pl



**DOLNOŚLĄSKIE CENTRUM TRANSPLANTACJI KOMÓRKOWYCH**  
**Z KRAJOWYM BANKIEM DAWCÓW SZPIKU**  
 (Dyrektor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Lange)

ul. Grabiszyńska 105  
 53-439 Wrocław  
 tel. +48 (71) 7831375  
 fax: +48 (71) 3621512  
 sekretariat@dcik.wroc.pl

## Warsztaty Kontroli Jakości Typowania HLA dla Krajów Europy Środkowej i Wschodniej

**XVIII tura - marzec 2012**

**Laboratoria uczestniczące:**

Chorwacja: University Hospital Centre Osijek, **Osijek**; Clinical Hospital Zagreb, **Zagreb**;  
 Czechy: University Hospital Olomouc, **Olomouc**; HLA Laboratory of the Czech National Marrow Donors Registry, University Hospital Pilsen, **Pilsen**; Institute of Hematology and Blood Transfusion, **Prague**;  
 Litwa: Laboratory of Hematology and General Cytology, Kaunas Medical University Hospital, **Kaunas**; Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, **Vilnius**;  
 Polska: Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, **Białystok**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, **Bydgoszcz**; Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, **Gdańsk**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa; **Katowice**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa; **Kielce**; Uniwersytecki Szpital Dziecięcy, **Kraków**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa; **Kraków**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, **Lublin**; Uniwersytet Medyczny, **Łódź**; Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika, **Łódź**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, **Poznań**; Pomorska Akademia Medyczna, **Szczecin**; Instytut Hematologii i Transfuzjologii, **Warszawa**; Wojskowy Instytut Medyczny, **Warszawa**; Pracownia Dawców Szpiku, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, **Warszawa**; Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, **Warszawa**; Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Centrum Leczenia Obrażeń, **Warszawa**; Medigen, **Warszawa**; Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, **Warszawa**; Fundacja na Rzecz Chorych z Chorobami Krwi, **Warszawa**; Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku, **Wrocław**; NZOZ przy IITD PAN, **Wrocław**;  
 Rosja: Tissue Typing Laboratory, Clinical Center for Cellular Technologies, **Samara**; Stem Cell Bank Pokrovski Ltd., **St. Petersburg**; Russian Institute of Haematology and Transfusiology, **St. Petersburg**;  
 Rumunia: National HLA Laboratory, National Institute of Hematology and Blood Transfusion "Pr. Dr. C.T. Nicolau", **Bucharest**;  
 Serbia: Institute for Blood Transfusion of Vojvodina, **Novi Sad**;  
 Turcja: Medical Faculty of Istanbul, Istanbul University, **Istanbul**; Özel Gayrettepe Florence Nightingale Hospital, **Istanbul**;  
 Węgry: Laboratory of Transplantation Immunogenetics, National Blood Transfusion Service, **Budapest**; HLA Typing Laboratory, Regional Blood Transfusion Center of Debrecen, **Debrecen**.

Laboratorium: .....

Adres: .....

Kierownik/Uczestnik: .....

uczestniczy w warsztatach kontroli jakości od ..... roku.

Wyniki typowania XVIII tury warsztatów laboratorium mieszczą się w zakresie oczekiwanej poprawności typowania (wyniki zgodne/liczba przesłanych próbek):

1. serologicznego HLA locus A i B		<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	(10/10 próbek)
2. genetycznego HLA locus A i B	niska rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <del>nie uczestniczy</del>	
3. genetycznego HLA locus C	niska rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
4. genetycznego HLA locus DRB1	niska rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <del>nie uczestniczy</del>	(10/10 próbek)
5. genetycznego HLA locus DQB1	niska rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
6. genetycznego HLA locus A i B	wysoka rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
7. genetycznego HLA locus C	wysoka rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
8. genetycznego HLA locus DRB1	wysoka rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
9. genetycznego HLA locus DQB1	wysoka rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	
10. genetycznego HLA locus DPB1	wysoka rozdzielczość	<del>tak</del> / <del>nie</del> / <b>nie uczestniczy</b>	

.....  
 prof. dr hab. Andrzej Lange

**Koordynator**

.....  
 dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik, prof. PAN

**Organizator**

Rycina 20.2: Wzór certyfikatu uczestnictwa w XVIII turze warsztatów standaryzacyjnych.

## 20.4. Podsumowanie

Prawidłowe oznaczanie antygenów zgodności tkankowej stanowi podstawę odpowiedniego doboru dawcy narządu czy alogenicznych komórek krwiotwórczych a ryzyko wystąpienia powikłań po przeszczepie jest tym mniejsze im dobór pary dawca–biorca jest bardziej precyzyjny. Dla zwiększenia niezawodności typowania tkankowego dobór pary dawca-biorca przeszczepienia powinien odbywać się w oparciu o pewne, wystandaryzowane techniki i przeprowadzony przez wykwalifikowanych pracowników laboratorium. Aby sprostać tym wymaganiom działalność laboratoriów HLA powinna być oparta o rygorystyczny system kontroli jakości obejmujący nie tylko metodykę badań, lecz również przeszkolenie personelu i odpowiednie wyposażenie pracowni.

Laboratoria starające się o pozwolenie na wykonywanie typowania tkankowego oraz uzyskanie akredytacji Europejskiej Federacji Immunogenetyki zobowiązane są do brania udziału w warsztatach kontroli jakości pozwalających na wystandaryzowanie wszystkich stosowanych w laboratorium technik oznaczania HLA. Udział w Warsztatach Kontroli Jakości Typowania HLA pozwala na weryfikację własnych oznaczeń i określenie typu obserwowanych niezgodności wyników typowania a w konsekwencji prowadzi do obniżenia ryzyka błędów metodycznych oraz podwyższenia jakości, wiarygodności i odtwarzalności badań.

## Literatura

- [1] Bogunia-Kubik K., Lange A.: Typowanie antygenów zgodności tkankowej u potencjalnych dawców i biorców przeszczepów komórek hematopoetycznych, *Acta Haematol Pol*, 2000; 31(2): 113-125
- [2] Lange A., Dera-Joachimiak D., Polak M., Kościńska K., Bogunia-Kubik K.: Uwarunkowania genetyczne doboru pary dawca - biorca alogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych. W: *Hematologia molekularna - patogeneza, patomechanizmy, metody badawcze i interpretacja wyników. / Molekularne procedury związane z przeszczepianiem komórek hematopoetycznych.* Redaktorzy: M. Witt, T. Szczepański, M. Dawidowska, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 2009, 163-176
- [3] Bogunia-Kubik K., Kościńska K., Polak M., Lange A.: MHC class III typing in donor selection for allogeneic haematopoietic stem cell transplants. W: Lange A. (ed.): *Focus on Immunology Research: Standardization of donor-recipient matching in transplantation (chapter IV/3).* Hauppauge (N.Y.), USA: Nova Publishers Inc., 2006
- [4] Bogunia-Kubik K., Wysoczanska B. Lange A.: Non-HLA gene polymorphisms and the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006; 1(2): 239-253
- [5] Bogunia-Kubik K., Polak M., Kościńska K., Jaskuła E., Lange A.: Chromosome 6 gene polymorphisms as factors affecting HSCT outcome. W: *2nd European Congress of Immunology – ECI – Berlin (Germany), September 13-16, 2009* Reinhold E. Schmidt Ed; Medimond, Monduzzi Editore, Bologna (Italy), *International Proceedings 2009*, 361-364
- [6] Bogunia-Kubik K., Mizia S., Polak M. i wsp.: CXCL12-3'A allele if present in transplanted material associates with lower toxicity but if in recipients makes them less sen-

## 20. Znaczenie standaryzacji badań immunogenetycznych...

- sitive to acute GvHD - Polish Donor-Recipient Study Group, *Tissue Antigens*, 2012; 79(6): 442
- [7] Bogunia-Kubik K., Mizia S., Polak M. i wsp.: CCR5 gene polymorphism affect the risk of GvHD after haematopoietic stem cell transplantation from alternative donor - Polish Donor-Recipient Study Group, *Tissue Antigens*, 2012; 79(6): 482-483
- [8] Bogunia-Kubik K.: Metody typowania antygenów zgodności tkankowej klasy II locus HLA-DR oparte na analizie DNA, *Post Hig Med Dośw*, 1997; 51(5): 479-489
- [9] Polak M. Kościńska K., Pietraszek E., Bogunia-Kubik K. & Lange A.: Metody genetyczne typowania specyficzności HLA. W: *Hematologia molekularna - patogeneza, patomechanizmy, metody badawcze i interpretacja wyników. / Molekularne protokoły diagnostyczne*. Redaktorzy: M. Witt, T. Szczepański, M. Dawidowska, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 2009, 217-226
- [10] Bogunia-Kubik K., Polak M., Pacuszko T., Lange A.: Confirmatory typing results of the National Polish Bone Marrow Donor Registry, *Bone Marrow Transplant*, 1998; 22 Suppl. 4: S45-46
- [11] Bogunia-Kubik K., Lange A.: Proficiency Testing of HLA Class I for Central-East Europe. W: Lange A. (ed.): *Focus on Immunology Research: Standardization of donor-recipient matching in transplantation (chapter III/2)*. Hauppauge (N.Y.), USA: Nova Publishers Inc., 2006
- [12] Bogunia-Kubik K., Łaba A., Lange A.: Raport z warsztatów kontroli jakości typowania antygenów zgodności tkankowej, *Acta Haematol Pol*, 2000; 31(2): 205-211
- [13] Bogunia-Kubik K., Łaba A., Lange A.: Sprawozdanie z II tury warsztatów kontroli jakości typowania antygenów zgodności tkankowej, *Post Hig Med Dośw*, 2000; 54(6): 759-766
- [14] Bogunia-Kubik K., Lange A.: Development of the HLA proficiency testing for Central and East Europe, *Int J Immunogenet*. 2008; 35(4-5): 409-416
- [15] Bogunia-Kubik K., Lange A.: HLA Proficiency Testing for Central and Eastern Europe: a summary of over 10 years of activity, *Transplant Proc*, 2010; 42(8): 3263-5
- [16] Bogunia-Kubik K., Wysoczańska B., Lange A.: HLA Proficiency Testing for Central and East Europe – Summary of the XVII trial, *Tissue Antigens*, 2012; 79(6): 530

ISBN 978-83-61512-40-0



9 788361 512400