

©Borgis

*Barbara Piątosa¹, Maja Klauedel-Dreszler²

Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce neutropenii

Flow cytometry in diagnostics of neutropenia

¹Pracownia Zgodności Tkankowej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
Kierownik Pracowni: dr n. przyr. Barbara Piątosa

²Klinika Immunologii Klinicznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Ewa Bernatowska

Streszczenie

Granulocyty wielojądrowe, neutrofile, stanowią najważniejszy element komórkowy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Powstają one w szpiku na drodze różnicowania z wielopotencjalnej komórki macierzystej. Kolejne stadia różnicowania różnią się pomiędzy sobą morfologicznie, zdolnością do podziałów, metabolicznie, a także ekspresją antygenów powierzchniowych. Niewystarczająca liczba lub aktywność neutrofilii manifestuje się zakażeniami, czasem o dramatycznym przebiegu.

Neutropenia jest heterogenną grupą zaburzeń charakteryzujących się zwiększoną podatnością na zakażenia bakteryjne. Najczęściej jest wtórna do działania leków, czynników środowiskowych lub niektórych patogenów. Może być jednak warunkowana genetycznie i spowodowana zaburzeniami granulopoezy w następstwie zahamowania dojrzewania, wzmożonej apoptozy lub retencji dojrzałych granulocytów w szpiku. Wykorzystując różnice w ekspresji antygenów powierzchniowych cytometria przepływowa pozwala na ocenę poszczególnych stadiów rozwojowych linii mieloidalnej, umożliwiając zarówno badanie defektów rozwojowych, ocenę nadmiernego niszczenia obwodowego komórek linii mieloidalnej, jak i towarzyszących neutropenii zaburzeń w zakresie innych komórek układu odpornościowego. Technika ta pozwala także na badanie sprawności mechanizmów związanych z aktywnością bójczą komórek żernych oraz wykrywanie przeciwciał będących przyczyną neutropenii powstałej w przebiegu procesów immunizacyjnych. Przedstawiono wybrane przykłady wykorzystania cytometrii w diagnostyce neutropenii wrodzonej oraz będącej skutkiem procesów immunizacji.

Złożoność patomechanizmów prowadzących do przewlekłej neutropenii sprawia, że wyniki badań cytometrycznych dostarczają informacji komplementarnych do klasycznych badań morfologicznych. Pozwalają bowiem na zbadanie bardzo dużej liczby komórek, umożliwiają równoczesną ocenę innych niż mieloidalna linii komórkowych oraz aktywności enzymów kluczowych dla prawidłowej funkcji granulocytów. Dzięki temu, w wielu przypadkach, możliwe jest znaczne skrócenie czasu potrzebnego do ustalenia prawidłowego rozpoznania i wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego.

Słowa kluczowe: neutropenia, cytometria przepływowa, zaburzenia dojrzewania neutrofilów

S u m m a r y

Polymorphonuclear granulocytes, neutrophils, are the most important cellular components of innate immune response. They are produced in bone marrow during a complex differentiation process from multipotential stem cells. Individual differentiation stages differ in morphology, proliferating ability and metabolic features. Inadequate number or activity of neutrophils is manifested by infections, which may be extremely severe.

Neutropenia composes a heterogeneous group of disorders with increased susceptibility to bacterial infections. Most usually, neutropenia is drug-related or secondary to environmental factors or pathogens. It may be also congenital, associated with defective granulopoiesis due to maturation defects, increased apoptosis or myelokathexis. Differences in expression of surface antigens among individual myeloid maturation stages make flow cytometry a useful tool in evaluation of granulopoiesis and its defects, as well as diagnostics of neutropenia associated with other cellular disorders. The technique allows also evaluation of efficiency of killing mechanisms, as well as detection of anti-granulocyte antibodies causing immune neutropenia. Selected examples of application of flow cytometry in diagnostics of congenital and immune neutropenia have been presented.

Complexity of pathomechanisms leading to chronic neutropenia makes flow cytometry a very useful tool, providing pieces of information complementary to classical morphologic studies. It allows analysis of very large number of myeloid cells, simultaneous examination of other cell lines, as well as evaluation of activity of enzymes, leading to significant reduction of time necessary to obtain correct diagnosis and implementation of adequate therapy.

Key words: neutropenia, flow cytometry, neutrophil maturation disorders

WSTĘP

Granulocyty wielojądrowe, neutrofile, stanowią najważniejszy element komórkowy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Powstają one w szpiku na drodze różnicowania z wielopotencjalnej komórki macierzystej. Kolejne stadia różnicowania, od najmłodszego mieloblasta poprzez promielocyt, mielocyt, metamielocyt, granulocyt z jądrem pałeczkowatym po neutrofil z jądrem segmentowanym, różnią się pomiędzy sobą morfologicznie, zdolnością do podziałów, metabolicznie, a także ekspresją antygenów powierzchniowych (1). Dojrzewanie od etapu mieloblasta do dojrzałego neutrofila z jądrem podzielonym trwa około 10-12 dni. Neutrofile są komórkami krótkożyjącymi (12-72 godzin), lecz dzięki ekspresji swoistych receptorów ułatwiających toczenie, wiązanie i przyleganie do śródbłonna naczyniowego i produkcji licznych cytokin i chemokin mogą działać w pierwszej linii obrony (2, 3). Granulocyty wielojądrowe odgrywają zasadniczą rolę w odpowiedzi zapalnej na zakażenia bakteryjne i grzybicze (4, 5), gojeniu ran i sterowaniu odpowiedzią immunologiczną (6). Niewystarczająca liczba lub aktywność neutrofilii manifestuje się zakażeniami, czasem o dramatycznym przebiegu.

Neutropenia jest to obniżenie całkowitej liczby neutrofilów we krwi obwodowej poniżej 1500 komórek/mm³, najczęściej wtórnie do działania czynników środowiskowych, niektórych patogenów lub leków. Może być jednak spowodowana obecnością auto- lub alloprzeciwciał, względnie powstawać w wyniku defektów genetycznych (4). Zmniejszenie całkowitej liczby neutrofilii poniżej 1000 komórek/mm³ wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakażeń, natomiast ciężkich infekcji – po zmniejszeniu liczby neutrofilii poniżej 500 komórek/mm³ (7). Ze względu na fizjologiczne zmiany liczby neutrofilii w różnych grupach wiekowych definicja neutropenii zmieniona została dla dzieci pomiędzy 2. a 24. miesiącem życia, dla których za neutropenię uważa się spadek liczby neutrofilii poniżej 1000 komórek/mm³ (8, 9).

Za neutropenię wrodzoną uważa się wszystkie uwarunkowane genetycznie defekty związane ze zmniejszeniem liczby neutrofilii (10). Jest to heterogenna grupa zaburzeń charakteryzujących się zwiększoną podatnością na zakażenia bakteryjne, spowodowaną zaburzeniami granulopoezy w następstwie zahamowania dojrzewania, wzmożonej apoptozy lub retencji dojrzałych granulocytów w szpiku. Nieprawidłowym wynikiem badania morfologicznego krwi obwodowej i szpiku towarzyszą charakterystyczne objawy kliniczne.

Cytometria przepływowa jest techniką analityczną pozwalającą na szybki pomiar rozproszonego światła lub sygnałów fluorescencji emitowanych przez odpowiednio naświetlone komórki. Umożliwia zarówno jakościową, jak i ilościową ocenę właściwości fizycznych i biologicznych komórek oraz niektórych ich składowych. Metoda ta została odkryta jako ulepszenie mikroskopu fluorescencyjnego i cechuje się wysoką

wydajnością, która pozwala na analizowanie różnych parametrów w dużej liczbie komórek, w stosunkowo krótkim czasie. W ostatnich latach cytometria przepływowa stała się ważną techniką stosowaną w diagnostyce i monitorowaniu różnych zaburzeń komórkowych, nie tylko pierwotnych niedoborów odporności związanych z defektami limfocytów, ale także w ocenie zaburzeń różnicowania i dojrzewania pozostałych linii hematopoetycznych (11), umożliwiając zarówno badanie defektów rozwojowych linii mieloidalnej, jak i ocenę nadmiernego niszczenia obwodowego, sprawności mechanizmów związanych z aktywnością bójczą komórek żernych oraz towarzyszących neutropenii zaburzeń w zakresie innych komórek układu odpornościowego. Uzyskane informacje pomagają w ocenie patomechanizmu choroby, mogą również wskazać ewentualne drogi w postępowaniu terapeutycznym, szczególnie w przypadkach o niejednoznacznym obrazie klinicznym. Poniżej zostaną przedstawione wybrane przykłady wykorzystania cytometrii w diagnostyce neutropenii.

OCENA GRANULOPOEZY SZPIKOWEJ

Szpik stanowi złożoną tkankę, zawierającą komórki należące do wielu linii, znajdujące się na różnych etapach rozwoju. Dojrzewaniu granulocytów, podobnie jak innych komórek hematopoezy szpikowej towarzyszy zmiana ekspresji antygenów powierzchniowych, odzwierciedlająca poszczególne etapy dojrzewania. Odpowiednie kompozycje przeciwciał monoklonalnych umożliwiają skuteczną ocenę granulopoezy szpikowej, z wykorzystaniem np. przeciwciał skierowanych przeciwko molekułom powierzchniowym CD10, CD11b, CD13, CD16, CD24, CD33, CD34, CD35, CD45, CD49d, CD64, CD87, CD117 (tab. 1) (1, 11, 12).

CYTOMETRIA W DIAGNOSTYCE NEUTROPENII, W KTÓRYCH GŁÓWNYM ZABURZENIEM JEST DEFEKT DOJRZEWANIA LINII MIELOIDALNEJ

Ocena granulopoezy szpikowej przydatna jest w neutropeniach spowodowanych zahamowaniem dojrzewania linii mieloidalnej w szpiku. W niektórych przypadkach zaburzeniom granulopoezy towarzyszą także zaburzenia ilościowe lub jakościowe dotyczące innych linii komórkowych.

Ciężka wrodzona neutropenia (*severe congenital neutropenia – SCN*) stanowi heterogenną grupę niedoborów charakteryzujących się istotnym zmniejszeniem liczby neutrofilii w szpiku oraz krwi obwodowej, będąc przyczyną nawracających ciężkich zakażeń bakteryjnych, rzadziej grzybiczych (13). Mutacje w genie *ELANE* (dawniej *ELA2*), kodującym elastazę neutrofilii, odpowiadają za około 50% ciężkiej wrodzonej neutropenii, dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący, przejawiającej się w postaci przewlekłej lub cyklicznej (14). Neutropenia spowodowana jest nasileniem apoptozy komórek progenitorowych linii granulocytarnej, co daje obraz pozornego „bloku dojrzewania” na etapie promielocyta lub mielocyta (14, 15).

Tabela 1. Ekspresja powierzchniowa markerów charakterystycznych dla poszczególnych stadiów rozwojowych linii granulocytarnej obecnych w szpiku. Znaczenie symboli i skrótów: – brak ekspresji, + słaba ekspresja, ++ umiarkowana ekspresja, +++ silna ekspresja; blast – mieloblast, promielo – promielocyt, mielo – mielocyt, metamielo – metamielocyt, pałka – neutrofil z jądrem pałeczkowatym, segment – neutrofil z jądrem segmentowanym.

Marker powierzchniowy	Blast	Promielo	Mielo	Metamielo	Pałka	Segment
CD10	–	–	–	–	–	++
CD11b	–	–	+ / +++	++	++	++
CD13	++	++	+	+	+	++
CD16	–	–	–	+	++	+++
CD24		–	++	++	++	++
CD33	+++	+++	++	+	+	+
CD34	+	–	–	–	–	–
CD35	–	–	–	–	++	++
CD49d	++	++	++	+	–	–
CD64		+	++	++	–	–
CD87					++	++
CD117	+	–	–	–	–	–
HLA-DR	+	–	–	–	–	–

Opisano przeszło 50 różnych mutacji, jednakże nie znaleziono związku pomiędzy poszczególnymi mutacjami a obrazem klinicznym, z wyjątkiem mutacji G185R, w wyniku której obserwuje się agranulocytozę, oporność na leczenie G-CSF oraz zwiększoną podatność na rozwinięcie białaczki (16).

W badaniu cytometrycznym szpiku można wykazać „zahamowanie” dojrzewania linii mieloidalnej. We krwi obwodowej zaobserwowano ponadto o połowę niższą ekspresję wewnątrzkomórkową katelicydyny (CAMP) i lipokaliny (NGAL) w ziarnistościach wtórnych neutrofilii (17).

Głęboki niedobór dojrzałych postaci komórek linii mieloidalnej, podobny jak w mutacjach *ELANE*, możliwy do wykrycia za pomocą cytometrii przepływowej obserwuje się również w zespole Kostmanna warunkowanym mutacją w genie *HAX1* (18). Mutacje w *HAX1* są także przyczyną zaburzeń w obwodowym dojrzewaniu limfocytów B (19).

Zaburzenia granulopoezy szpikowej, podobne jak w neutropenii warunkowanej mutacjami w genach *ELANE* i *HAX1*, obserwowane są we wrodzonej neutropenii związanej z mutacjami w genie *G6PC3* kodującym podjednostkę katalityczną fosfatazy glukozo-6-fosforanowej (20). Badaniem różnicującym tę postać ciężkiej wrodzonej neutropenii może być cytometryczna ocena ekspresji receptora chemokinowego CXCR4, wybiórczo nasilonej na neutrofilach i komórkach NK chorych, co sprzyja mielokateksji (retencja dojrzałych granulocytów do szpiku) obserwowanej u niektórych pacjentów (21). Należy jednak pamiętać, że nasilenie ekspresji receptora CXCR4 na neutrofilach jest również cechą charakterystyczną zespołu WHIM (22).

Zahamowanie dojrzewania linii mieloidalnej w szpiku, związane z neutropenią umiarkowaną lub ciężką, obserwuje się również w neutropenii sprzężonej z chromosomem X, warunkowanej mutacjami aktywującymi L270P (23) i I294T (24) w genie WAS.

Ze względu na powszechną ekspresję białka Wiskotta-Aldricha w komórkach krwiopochodnych, nawet na etapie komórek prekursorowych (25), neutropenii w wyniku mutacji aktywującej w *WAS* towarzyszy nasilona apoptoza komórek prekursorowych linii mieloidalnej (23, 26), monocytopenia (16) oraz rozpoznawane za pomocą cytometrii przepływowej obniżenie liczby komórek NK i limfocytów B. Odwrócenie stosunku limfocytów T CD4:CD8 jest spowodowane podwyższeniem odsetka limfocytów T CD8+ (23, 24). Wobec nie do końca znanych skutków mutacji dla struktury białka oraz zdolności wiązania dostępnych przeciwciał monoklonalnych nie jest obecnie jasne, czy cytometryczna ocena wewnątrzkomórkowej ekspresji białka WASP ma znaczenie diagnostyczne w neutropenii sprzężonej z chromosomem X (27).

Mutacje w genie niezależnego czynnika wzrostu 1 (*GF11*) są przyczyną rzadkiej autosomalnej dominującej postaci ciężkiej przewlekłej neutropenii, manifestującej się zahamowaniem dojrzewania granulocytów w szpiku. W przebiegu choroby występuje również limfopenia T i B (28, 29).

Zaburzenia różnicowania granulocytów obserwuje się również m.in. w dysgenезji siateczki warunkowanej mutacją w genie kinazy adenylowej 2 (*AK2*) (30, 31), a także niedoborze ziarnistości swoistych neutrofilii, zespole Hermansky’ego-Pudlaka typu 2, zespole Griscellego typu 2 oraz zespole Chediaka-Higashiego (16).

ZNACZENIE OCENY DOJRZEWANIA LIMFOCYTÓW B W SZPIKU W DIAGNOSTYCE NEUTROPENII

Neutropenia o różnym stopniu nasilenia towarzyszy stosunkowo licznej grupie pierwotnych niedoborów odporności, manifestujących się głębokim defektem humoralnym, spowodowanym nieprawidłowościami w zakresie liczby lub funkcji limfocytów B. W szpiku zachodzi istotna część procesu dojrzewania limfocytów

B, bez których nie jest możliwa produkcja immunoglobulin. Ze względu na brak charakterystycznych cech morfologicznych różniących poszczególne stadia rozwojowe limfocytów B, badanie morfologiczne (mielogram) nie wnosi istotnych informacji poza ewentualnym stwierdzeniem zahamowania dojrzewania linii granulocytarnej. Natomiast cytometria pozwala na zróżnicowanie 9 stadiów rozwojowych limfocytów B, o charakterystycznej ekspresji markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych, obecnych w normalnych warunkach w szpiku, w proporcjach charakterystycznych dla różnych grup rozwojowych tych komórek (tab. 2) (32).

Defekt w zakresie dojrzewania prekursorów limfocytów B z jednoczesnym zahamowaniem granulopoezy szpikowej odnotowano u około 25% pacjentów z agammaglobulinemią sprzężoną z chromosomem X, warunkowaną mutacjami w genie kinazy tyrozynowej Brutona (*BTK*) (32-35). W obrazie cytometrycznym krwi obwodowej obserwuje się głęboki niedobór limfocytów B, zaburzenie ekspresji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej Brutona w nielicznych obecnych limfocytach B oraz monocytach, a także zahamowanie dojrzewania prekursorów limfocytów B na etapie pre-BI/pre-BII (32, 36). Zahamowanie granulopoezy szpikowej, którym towarzyszy limfopenia, zaburzenia dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych oraz charakterystyczne nasilenie ekspresji receptora chemokinowego CXCR4 na neutrofilach występują w zespole WHIM (*Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis* – WHIM) (9, 22, 37).

Jakkolwiek neutropenia w pospolitym zmiennym niedoborze odporności nie jest warunkowana defektem genetycznym, lecz powstaje w mechanizmie autoimmunizacji, to w obrazie choroby u części pacjentów obserwuje się wczesny blok dojrzewania prekursorów linii B w szpiku (38).

NEUTROPENIA W PRZEBIEGU DEFECTÓW DOTYCZĄCYCH W PRZEWAŻAJĄCEJ CZĘŚCI LINII KOMÓRKOWYCH INNYCH NIŻ KOMÓRKA MIELOIDALNE

Przewlekła neutropenia, od umiarkowanej po ciężką, występuje stale lub okresowo u ponad połowy pacjentów z zespołem hiper-IgM warunkowanym mutacjami w genie ligandu dla CD40 (*CD40LG*) (39). Mutacje te są przyczyną zaburzeń w przełączaniu klas immunoglobulin, wskutek czego w surowicy chorych występuje głównie immunoglobulina M (często w podwyższonych stężeniach, stąd nazwa zespołu). Stężenia pozostałych izotypów immunoglobulin są znacznie obniżone w wyniku zaburzeń dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych (40). W szpiku występuje wysoki blok dojrzewania linii mieloidalnej, powstały w mechanizmie zaburzeń oddziaływania pomiędzy CD40 na limfocytach B a ligandem dla CD40 (CD40L) obecnym na komórkach podścieliska szpiku. Interakcja ta w prawidłowych warunkach indukuje uwalnianie z podłoża szpiku cytokin (w tym G-CSF) wspierających granulopoezę, a w stanach zapalnych prowadzi do wzmożonej apoptozy zależnej od Fas (41). Cytometria przepływowa umożliwia stwierdzenie bloku dojrzewania linii mieloidalnej w szpiku, zahamowania procesu dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych, a przede wszystkim wykazanie zaburzeń ekspresji ligandu dla CD40 na aktywowanych limfocytach T pomocniczych (42).

Neutropenia przewlekła lub okresowa, z zachowanym prawidłowym torem dojrzewania linii mieloidalnej w szpiku, hipergammaglobulinemią pomimo głębokiej limfopenii B, znacznym obniżeniem limfocytów T CD4+ i podwyższeniem odsetka limfocytów T CD8+, obniżeniem odsetka limfocytów T pamięci, znacznym nasileniem apoptozy limfocytów T i granulocytów obwodowych obserwowana jest w przebiegu defektu warunkowanego mutacją w genie kinazy 4 serynowo-

Tabela 2. Ekspresja markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych w poszczególnych stadiach dojrzewania limfocytów B.

Marker	Pro-B			Pre-BI		Pre-BII		Niedojrzałe	Dojrzałe
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7		
CD10	-	-	-	++	+	+	+	+	+
CD19	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CD20	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CD22	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	+	+	-	-	-	-
clgM	-	-	-	-	-	+	+	+	+
slgM	-	-	-	-	-	-	-	+	+
slgD	-	-	-	-	-	-	-	-	+

treoninowej (*STK-4*, dawniej *MST1*), białka o funkcjach zarówno pro-, jak i antyapoptotycznych. W obwodowym dojrzewaniu limfocytów B obserwuje się nagromadzenie komórek na przejściowym etapie dojrzewania (43).

NEUTROPENIA Z ZABURZENIAMI CZYNNOSCIOWYMI NEUTROFILI

Neutrofile wchodzą w skład układu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej stanowiącej pierwszą linię obrony przed patogenami. Wewnątrzkomórkowe niszczenie patogenów odbywa się głównie w wyniku pobudzanych przez fagocytozę tlenowych mechanizmów zabijania. Najważniejszym etapem tego procesu jest utworzenie aktywnego kompleksu oksydazy NADPH, składającego się z składników konstytutywnie wbudowanych w błonę komórkową gp22^{phox} i gp91^{phox} tworzących cytochrom gp40^{phox}, gp67^{phox}, gp47^{phox}, a także GTP-azy Rac1 lub Rac2 (44). Brak zdolności utworzenia aktywnego kompleksu oksydazy NADPH, w wyniku genetycznie uwarunkowanego braku któregokolwiek z jej składników, jest przyczyną powstania przewlekłej choroby ziarniniakowej (45).

Neutropenia w przebiegu glikogenozy typu Ib jest spowodowana defektem białka transportującego glikozylo-6-fosforan. Translokaza ta kodowana jest przez gen *SLC37A4* (46). Zaburzenia metabolizmu glukozy odbijają się na zdolności do generowania reaktywnych metabolitów tlenu, co powoduje upośledzenie wybuchu tlenowego oraz nasiloną apoptozę neutrofilii (47). Stopień upośledzenia wybuchu tlenowego może być różny, większy u dzieci poniżej 7. roku życia, lecz zazwyczaj ulega korekcji pod wpływem leczenia rekombinowanym czynnikiem wzrostu kolonii granulocytarnych (rHuG-CSF) (9). Upośledzenie aktywności enzymatycznej komórek w zakresie wybuchu tlenowego i chemotaksji, towarzyszące zaburzeniom dojrzewania, obserwuje się również w niedoborze glukozy-6-fosfatazy, warunkowanej mutacją w genie *G6PC3*, kodującym katalityczną podjednostkę 3 glukozy-6-fosfatazy (16, 20). Cytometryczna ocena sprawności kompleksu oksydazy NADPH opiera się na ocenie zdolności utleniania przez nadtlenek wodoru, produkowany w komórkach pod wpływem stymulacji estrem forbolu, nieposiadającej właściwości fluorescencyjnych dihydrorodaminy 123 do posiadającej je rodaminy 123 (48). Możliwe jest dokonanie oceny sprawności całkowitej enzymu, jak również wskazanie częściowego jej upośledzenia (49, 50).

Mutacja w genie *MAP3IP* kodującym endosomalne białko adaptorowe p14 wiąże się z neutropenią obwodową, przy zachowanym prawidłowym dojrzewaniu szpikowym. Defekt wiąże się z obniżeniem odsetka komórek B pamięci, zaburzeniami czynności limfocytów B, cytotoksycznych limfocytów T i neutrofilii (51).

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ DO WYKRYWANIA PRZECIWCIAŁ PRZECIWGRANULOCYTARNYCH

Neutropenia może być skutkiem procesów zarówno auto-, jak i alloimmunizacyjnych. Niezależnie od tego, czy źródłem immunizacji są antygeny własne (autoprzeciwciała), czy też antygeny obce (alloprzeciwciała), kluczową wartość diagnostyczną ma wykrycie obecności przeciwciał związanych z granulocytami lub obecnych w surowicy pacjenta. Jakkolwiek zniszczenie segmentów i pałek, a nawet metamielocytów, w mechanizmie autoimmunizacji może imitować zahamowanie dojrzewania mielopoety na poziomie mielocyta/metamielocyta (52), to jednak najistotniejsze w diagnostyce jest wykrycie w surowicy badanego pacjenta obecności przeciwciał. Pomimo dostępności niezwykle nowoczesnych technik diagnostycznych brak jest obecnie standaryzacji, a znane dotychczas metodyki charakteryzują się dużym poziomem komplikacji technicznej, pracochłonności i stosunkowo wysokim kosztem (52).

W ostatnich latach podjęto badania nad wykorzystaniem cytometrii przepływowej do badań zarówno przesiewowych, jak i określających swoistość przeciwciał (52, 53). Najbardziej obiecującą techniką wydaje się badanie obecności przeciwciał związanych z neutrofilami, bez rozróżniania ich swoistości antygenowej, a tylko izotypu immunoglobuliny. Brak konieczności izolowania granulocytów pozwala uniknąć ich uszkodzenia, agregacji i autolizy. Wyznakowanie granulocytów w jednostopniowym badaniu za pomocą przeciwciała anti-CD10, skierowanego przeciwko dojrzałym neutrofilom, oraz wykorzystanie odpowiednich, znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał antyglobulinowych skierowanych przeciwko fragmentowi Fc przeciwciał związanych z neutrofilami badanego pacjenta, umożliwia szybkie i stosunkowo tanie wykonanie badania przesiewowego, którego wynik koreluje z nasileniem neutropenii, umożliwiając ograniczenie dalszej kosztownej diagnostyki (53).

PODSUMOWANIE

Niezwykła złożoność patomechanizmów prowadzących do przewlekłej neutropenii sprawia, że wyniki badań cytometrycznych dostarczają informacji komplementarnych do klasycznych badań morfologicznych. Pozwalają bowiem na zbadanie znacznie większej liczby komórek, umożliwiają równoczesną ocenę innych niż mieloidalna linii komórkowych (np. limfocyty T i B) oraz aktywności enzymów kluczowych dla prawidłowej funkcji granulocytów. Dzięki temu, w wielu przypadkach, możliwe jest znaczne skrócenie czasu potrzebnego do ustalenia prawidłowego rozpoznania i wdrożenia właściwego postępowania terapeutycznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Elghetany MT: Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2002; 28: 260-274.
2. Dinanuer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC: Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2000; 303-318.
3. Nathan C: Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-182.
4. van den Berg JM, Kuijpers TW: Defects in number and function of neutrophilic granulocytes causing primary immunodeficiency. *Eur J Pediatr* 2011; 170: 1369-76.
5. Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immun* 2005; 23: 197-223.
6. Cowburn AS, Condiliffe AM, Farahi N et al.: Advances in neutrophil biology: clinical complications. *Chest* 2008; 134: 606-612.
7. Schwartzberg LS: Neutropenia: Etiology and pathogenesis. *Clinical Cornerstone* 2006; 8 (suppl 5): S5-11.
8. Piątosza B, Wolska-Kuśnierz B, Siewiera K et al.: Distribution of leukocyte and lymphocyte subsets in peripheral blood. Age related normal values for preliminary evaluation of the immune status in Polish children. *Centr Eur J Immunol* 2010; 30: 168-175.
9. Klauudel-Dreszler M: Przewlekła neutropenia u dzieci – obraz kliniczny, diagnostyka, czynniki prognostyczne oraz leczenie. (Praca doktorska). Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka. Warszawa 2010.
10. Donadieu J, Fenneteau O, Baupain B et al.: Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 6: 26.
11. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK et al.: Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004; 60B: 1-13.
12. Elghetany MT, Ge Y, Patel J et al.: Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using morphologic assessments. *J Clin Lab Anal* 2004; 18: 36-41.
13. Skokowa J, Germeshausen M, Zeidler C et al.: Severe congenital neutropenia: inheritance and pathophysiology. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 22-28.
14. Horwitz M, Benson KF, Pearson RE et al.: Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 1999; 23: 433-436.
15. Dale DC, Person RE, Bolyard AA et al.: Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* 2000; 96: 2317-2322.
16. Bouma G, Ancliff PJ, Thrasher AJ et al.: Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *Br J Haematol* 2010; 151: 312-326.
17. Shiohara M, Shigemura T, Saito S et al.: Ela2 mutations and clinical manifestations in familial congenital neutropenia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31: 319-324.
18. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G et al.: Deficiency of HAX1 causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 2007; 39: 86-92.
19. Peckl-Schmid D, Wolkerstorfer S, Königsberger S et al.: HAX1 deficiency: impact on lymphopoiesis and B-cell development. *Eur J Immunol* 2010; 40: 3161-3172.
20. Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A et al.: A novel syndrome with severe congenital neutropenia is caused by mutations in G6PC3. *N Eng J Med* 2009; 360: 32-43.
21. McDermott DH, De Ravin SS, Jun HS et al.: Severe congenital neutropenia resulting from G6PC3 with increased neutrophil CXCR4 expression and myelokathexis. *Blood* 2010; 116: 2793-2802.
22. Kawai T, Malech HL: WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 20-26.
23. Devriendt K, Kim AS, Mathijs G et al.: Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Gen* 2001; 27: 313-317.
24. Beel K, Cotter MM, Blatny J et al.: A large kindred with X-linked neutropenia with I274T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Br J Haematol* 2008; 144: 120-126.
25. Parolini O, Berardelli S, Riedl E et al.: Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood* 1997; 90: 70-75.
26. Moulding DA, Blundell MP, Spiller DG et al.: Unregulated actin polymerization by WASP causes defects in mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J Exp Med* 2007; 204: 2213-2224.
27. Nakajima M, Yamada M, Yamaguchi K et al.: Possible application of flow cytometry for evaluation of the structure and functional status of WASP in peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Haematol* 2009; 82: 223-230.
28. Person RE, Li F-Q, Duan Z et al.: Mutations in proto-oncogene GF11 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 2003; 34: 308-312.
29. Notarangelo LD: Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: S182-194.
30. Legresle-Peyrou C, Six E, Picard C et al.: Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound haematopoietic defect associated with sensoryneural deafness. *Nat Gen* 2009; 41: 106-111.
31. Pannicke U, Hönig M, Hess I et al.: Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat Gen* 2009; 41: 101-105.
32. Noordzij JG, De Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM et al.: Composition of precursor B-cell compartment in bone marrow from patients with X-linked agammaglobulinemia compared with healthy children. *Pediatr Res* 2002; 51: 159-168.
33. Kanegane H, Taneichi H, Nomura K et al.: Severe neutropenia in Japanese patients with x-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2005; 25: 491-495.
34. Jacobs ZD, Guajardo JR, Anderson KM: XLA-associated neutropenia treatment: a case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 631-634.
35. Aghamohammadi A, Cheraghi T, Rezaei N et al.: Neutropenia associated with X-linked Agammaglobulinemia in an Iranian referral center. *Iran, J Allergy Asthma Immunol* 2009; 8: 43-47.
36. Fututani T, Miyawaki T, Tsukada S et al.: Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998; 91: 595-602.
37. Mc Guire PJ, Cunningham-Rundles C, Ochs H et al.: Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol* 2010; 135: 412-421.
38. Ochtrop ML, Goldacker S, May AM et al.: T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency. *Blood* 2011; 118: 309-318.
39. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C et al.: Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 1997; 131: 47-54.
40. Agematsu K, Nagumo H, Shinozaki K et al.: Absence of IgD-CD27+ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest* 1998; 102: 853-860.
41. Mavroudi I, Papadakaki V, Pyrovolaki K et al.: The CD40/CD40 ligand interactions exert pleiotropic effects on bone marrow granulopoiesis. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 771-783.
42. Freyer DR, Gowans LK, Warzynski M et al.: Flow cytometric diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome: application of an accurate and convenient procedure. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 363-370.
43. Abdollahpour H, Appaswamy G, Kotlarz D et al.: The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood* 2012; doi:10.1182/blood-2011-09-378158.
44. Cross AR, Segal AW: The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1657: 1-22.
45. Segal AW: The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 1996; 2: 129-135.
46. Beaudet AL, Anderson DC, Michels VV et al.: Neutropenia and impaired neutrophil migration in type IB glycogen storage disease. *J Pediatr* 1980; 97: 906-910.

47. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC: Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Curr Opin Hematol* 2010; 17: 36-42.
48. Henderson LM, Chappell JB: Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 1993; 217: 973-980.
49. O'Gorman MRG, Corrochano V: Rapid whole-blood flow cytometry assay for diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 227-232.
50. Mauch L, Lun A, O'Gorman MRG et al.: Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem* 2007; 54: 890-896.
51. Radhika V, Onesime D, Ha JH et al.: G α 1 3 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 49406-49413.
52. Sella R, Flomenblit L, Goldstein I et al.: Detection of anti-neutrophil antibodies in autoimmune neutropenia of infancy: A multicenter study. *IMAJ* 2010; 12: 91-96.
53. Hwang K, Park C-J, Huh HJ et al.: Flow cytometric detection of neutrophil-associated immunoglobulin in patients with or without neutropenia and establishment of reference intervals. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41: 144-149.

otrzymano/received: 07.05.2012
zaakceptowano/accepted: 04.06.2012

Adres/address:
*Barbara Piątośa
Pracownia Zgodności Tkankowej
Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa
tel.: +48 (22) 815-77-49
e-mail: b.piatosa@czd.pl