

©Borgis

*Monika Dzierżak-Mietła¹, Mirosław Markiewicz¹, Monika Sankowska², Agnieszka Karolczyk¹, Patrycja Zielińska¹, Anna Kocłęga¹, Krzysztof Białas¹, Sławomira Kyrz-Krzemień¹

Czy pełne typowanie alleliczne HLA rodzeństwa wykraczające poza zakres badania niezbędny dla segregacji haplotypów jest uzasadnione?*

High resolution typing of 10/10 HLA alleles in sibling donor/recipient pairs – is it justified by revealing existing mismatches undetected in standard matching?

¹Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrz-Krzemień

²NZOZ Medigen, Warszawa

Dyrektor: dr hab. Leszek Kauc

Słowa kluczowe

antygeny układu HLA, dobór dawcy, badanie doboru w zakresie HLA, rodzeństwo

Key words

HLA antigens, donor selection, HLA typing, siblings

Adres/address:

*Monika Dzierżak-Mietła
Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku SUM
ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice
tel. +48 (32) 256-28-58
monajka13@go2.pl

Streszczenie

Wstęp. Poszukiwanie dawcy do przeszczepienia allogenicznego komórek krwiotwórczych (allo-HCT) wśród rodzeństwa wymaga potwierdzenia zgodności haplotypów układu zgodności tkankowej HLA dawcy i biorcy. Badanie HLA rozpoczyna się zazwyczaj od typizacji niskiej rozdzielczości antygenów HLA-A, -B, -DR rodzeństwa i rodziców, co może być wystarczające dla wyboru zgodnego dawcy.

Cel pracy. Celem pracy było przeprowadzenie uzupełniającego typowania allelicznego dla sprawdzenia występowania ukrytych niezgodności u tych par rodzeństwa, których biorcy doświadczyli klinicznie istotnej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD).

Materiał i metody. Badania HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ wysokiej rozdzielczości wykonano z przechowywanych próbek DNA od 30 pacjentów i ich rodzeństwa – dawców zakwalifikowanych na podstawie badań niskiej rozdzielczości. Wskazaniami do allo-HCT wykonanych w latach 2003-2012 były nowotwory hematologiczne. U biorców doszło do wystąpienia ostrej GVHD stopnia III-IV (5 chorych), rozległej przewlekłej GVHD (16) bądź łącznie obydwu rodzajów GVHD niezależnie od stopnia (9).

Wyniki. Nie wykryto niezgodności allelicznych u żadnej z badanych par dawca-biorca. Ostra GVHD stopnia III-IV i rozległa przewlekła GVHD były obecne odpowiednio u 10 i 21 chorych, pomimo całkowitej zgodności 10/10 alleli HLA. U 13 chorych (43%) klinicznie istotne GVHD doprowadziło do niepomyślnego przebiegu po transplantacji zakończonego zgonem, pozostałych 17 chorych żyje.

Wnioski. Standardowe procedury stosowane w doborze dawcy spośród rodzeństwa są wystarczające, mimo iż nie wykluczają niezgodności alleli HLA.

Summary

Introduction. Although low resolution HLA-A, -B and -DR typing is usually sufficient for segregation of haplotypes required for approval of sibling donor for allogeneic hematopoietic cells transplantation (allo-HCT), it does not exclude undetected HLA mismatches.

Aim. The aim of this study was to perform high resolution typing of stored DNA samples from those sibling pairs transplanted in the past, whose recipients experienced clinically significant GVHD.

Material and methods. High resolution HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ typing was performed in 30 patients and their sibling donors qualified according to low resolution HLA typing, who underwent allo-HCT for hematological malignancies in 2003-2012 and developed either grade III-IV acute GVHD (5 pts), extensive chronic GVHD (16 pts), or both of any degree (9 pts).

**Badanie zostało przeprowadzone w ramach umowy statutowej KNW-1-087/P/2/0 oraz umowy młodego naukowca KNW-1-015/N/2/0.

Results. No allelic mismatches were detected in any donor-recipient pair. Acute grade III-IV and/or extensive chronic GVHD were present in 10 and 21 pts, respectively, despite the complete matching of 10/10 alleles HLA alleles. In 13 pts (43%) clinically significant GVHD has led to fatal post-transplant course, remaining 17 pts are alive.

Conclusions. Standard procedures used for matching of sibling donor-recipient pairs are sufficient, although they cannot exclude mismatched HLA alleles.

WSTĘP

W wielu chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego jedyną szansą na wyleczenie jest allogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HCT). W ramach procedury doboru dawcy w pierwszej kolejności przeprowadza się badania zgodności antygenów HLA potencjalnych dawców rodzinnych chorego (rodzeństwo), a w razie ich braku lub wykrytej niezgodności wszczynana się procedurę poszukiwania dawcy niespokrewnionego. Zgodność antygenów HLA I i II klasy w przypadku dawców rodzinnych bada się najczęściej metodą serologiczną (z użyciem surowic zawierających swoiste przeciwciała dla antygenów powierzchniowych) lub/i metodami biomolekularnymi opartymi na badaniu DNA z użyciem specyficznych dla DNA primerów (PCR-SSP) na poziomie niskiej rozdzielczości (ang. *low resolution*). Badanie układu HLA rozpoczyna się zazwyczaj od typizacji antygenów HLA-A, -B i -DR u całego posiadanego rodzeństwa i rodziców. Poszukiwanie wśród rodzeństwa dawcy komórek krwiotwórczych do transplantacji wiąże się jednocześnie z koniecznością potwierdzenia odziedziczenia po rodzicach tych samych haplotypów układu zgodności tkankowej HLA (1). Zwłaszcza w przypadku licznego rodzeństwa i dostępności rodziców ten ograniczony zakres badania może okazać się wystarczający do dokonania segregacji haplotypów HLA i wyboru zgodnego dawcy. Jeśli w powyższych badaniach uzyska się zgodność wyników HLA biorcy i dawcy i jednocześnie dokona się segregacji haplotypów HLA, potwierdzając ich jednakowe odziedziczenie, wówczas traktuje się dawcę rodzinną jako zgodną z biorcą i akceptuje się go do donacji komórek krwiotwórczych. W razie konieczności poszukiwania dawcy niespokrewnionego badania antygenów HLA biorcy i dawcy wykonuje się dokładniejszą i bardziej swoistą metodą PCR wysokiej rozdzielczości (ang. *high resolution*) wykrywającą allele kodujące antygeny HLA. Sposób prezentacji wyników przeprowadzonych badań HLA i ich interpretacji określają wytyczne ustalone przez Europejską Federację Immunogenetyki (2). Im wyższa jest rozdzielczość badania antygenów HLA, tym większe są szanse na dobór bardziej zgodnego dawcy, co przekłada się na poprawę wyników leczenia alloprzeszczepieniem komórek krwiotwórczych i dłuższe przeżycie m.in. poprzez zmniejszenie ryzyka powikłań poprzyszczepowych (np. ostrej lub przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi – GVHD) i lepszą jakość życia chorego (3). Choć uważa się, że przeszczepienia rodzinne są bezpieczniejsze od przeszczepień od dawców niespokrewnionych, to jednak w wielu

przypadkach mimo istniejącej zgodności dawcy i biorcy (zbadanej metodami serologicznymi lub opartymi na analizie DNA na niskim poziomie rozdzielczości) obserwujemy u chorych po przeszczepieniu ciężkie powikłania związane z ostrą lub przewlekłą chorobą przeszczep przeciw gospodarzowi, które w przypadku oporności na leczenie znacznie pogarszają jakość życia i w przypadku wysokiego stopnia zaawansowania mogą prowadzić do zgonu. Niektórzy chorzy, u których w przebiegu rodzinnego przeszczepienia obserwowano ciężkie powikłania w postaci odpornej na leczenie choroby GVHD nierzadko zakończone zgonem, w badaniu HLA metodą niskiej rozdzielczości wykazano pełną zgodność, natomiast w pojedynczych przypadkach, w których wykonano dokładniejsze badanie HLA II klasy metodą wysokiej rozdzielczości, wykazano niezgodności alleliczne mogące mieć bezpośredni związek z niepowodzeniem leczenia. W jednym z badań klinicznych realizowanych w naszym ośrodku, które dotyczyło oceny leczenia kondycjonującego, wśród wymogów włączenia znalazło się m.in. przeprowadzenie pełnej typizacji allelicznej HLA dawcy i biorcy. Wśród 15 włączonych par rodzeństwa, w 2 przypadkach (13%) pomimo wcześniejszego zatwierdzenia dawcy jako zgodnego na podstawie standardowego badania antygenów HLA, dodatkowo przeprowadzone typowanie alleliczne ujawniło pojedynczą niezgodność HLA. W jednym przypadku była to pojedyncza niezgodność alleliczna w antygenie HLA-C, a w drugim różnicę w pojedynczym allelu między dawcą i biorcą przeszczepu wykazano w zakresie antygenu HLA-DRB1. W obydwu przypadkach wskazaniem do wykonania przeszczepienia była ostra białaczka szpikowa. Jeden z opisanych biorców przeszczepu zmarł z powodu powikłań poprzyszczepowych. Można wysunąć hipotezę, że wykonanie badań alleli HLA metodą genetyczną na wysokim poziomie rozdzielczości u dawców i biorców rodzinnych zwiększyłoby szansę na wykrycie istniejących niezgodności, a tym samym umożliwiłoby dobór lepszego dawcy, przez co mogłoby poprawić jakość życia chorych i wyniki leczenia alloprzeszczepieniem.

CEL PRACY

Celem niniejszego badania było retrospektywne zbadanie występowania niezgodności allelicznych HLA poprzez przeprowadzenie typowania wysokiej rozdzielczości alleli HLA I i II klasy (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ) z przechowywanych próbek DNA od tych par rodzeństwa, u których biorcy doświadczyli klinicznie istotnego GVHD.

MATERIAŁ I METODY

Badania HLA wysokiej rozdzielczości wykonano u 30 pacjentów i ich rodzeństwa będącego dawcami. Dawcy byli uprzednio zakwalifikowani na podstawie wyników typowania HLA metodami o niskiej rozdzielczości.

Materiał do badania stanowiło DNA wyizolowane z krwi obwodowej, a następnie zamrożone. Typizacja 10 alleli kodujących antygeny układu zgodności tkankowej HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ metodą biomolekularną na wysokim poziomie rozdzielczości przeprowadzona została w laboratorium NZOZ Medigen w Warszawie.

Wskazaniami do przeszczepienia allogenicznego komórek krwiotwórczych (allo-HCT) były: ostra białaczka szpikowa (13 chorych), ostra białaczka limfoblastyczna (9 chorych), przewlekła białaczka limfocytowa (3 chorych), przewlekła białaczka szpikowa (2 chorych), włóknienie szpiku (2 chorych) i chłoniak złośliwy (1 chory). Przeszczepienia zrealizowano w latach 2003-2012 w Katedrze i Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

U biorców doszło do wystąpienia ostrej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD) stopnia III-IV (5 chorych), rozległej postaci przewlekłej GVHD (16 chorych) bądź łącznie obydwu rodzajów GVHD wymienionego (5 chorych) lub niższego (4 chorych) stopnia.

WYNIKI

Typowanie HLA wysokiej rozdzielczości przeprowadzone u 30 par dawca-biorca biorących udział w badaniu nie wykryło rozbieżności allelicznych. Ostra GVHD stopnia III-IV i rozległa postać przewlekłej GVHD były obecne odpowiednio u 10 i 21 chorych, pomimo całkowitej zgodności 10/10 alleli HLA-A, -B, -C, -DR i -DQ. U 13 chorych (43%) klinicznie istotne GVHD doprowadziło do niepomyślnego przebiegu po transplantacji zakończonego zgonem, pozostających 17 chorych żyje.

DYSKUSJA

Ponieważ antygeny HLA należą do głównych czynników, które inicjują zarówno odpowiedź biorcy na przeszczep, jak i reaktywność immunologiczną przeszczepionych komórek, maksymalną zgodność w ich zakresie pomiędzy dawcą i biorcą zalicza się do najważniejszych czynników wpływających na wyniki allogenicznych przeszczepień komórek krwiotwórczych (1, 4). Biorąc pod uwagę, że do najczęstszych przyczyn niepowodzeń leczenia przeszczepowego należą rozwój powikłań infekcyjnych i GVHD (30-40%), zminimalizowanie modyfikowalnych czynników wpływających na ich powstanie może przyczynić się do zwiększenia szans powodzenia leczenia tą metodą (5). Do takich działań należą eradykacja wszelkich potencjalnych ognisk infekcyjnych u biorcy i dobór jak najlepszego dawcy, tj. zgodnego w zakresie HLA, wieku,

plci, statusu serologicznego przeciwciał anti-CMV, jak i wyboru źródła komórek krwiotwórczych, które w przypadku krwi obwodowej niesie większe ryzyko rozwoju GVHD (z uwagi na wysoki odsetek limfocytów T), ale jednocześnie stanowi materiał przeszczepowy dający największą szansę na uzyskanie wszczepu, dzięki większej liczbie komórek CD34+ (3, 4).

Przed wykonaniem przeszczepienia zgodność rodzinnych par oznaczano metodą serologiczną i/lub genetyczną na poziomie niskiej rozdzielczości (zgodnie z przyjętymi kryteriami doboru w przeszczepieniach rodzinnych). W części przypadków obserwowano ciężkie powikłania w postaci ostrej i/lub przewlekłej choroby GVHD znacząco pogarszające jakość życia, niekiedy zakończzone zgonem biorcy. Wysłunęto hipotezę, że oznaczenie antygenów HLA metodą genetyczną na poziomie wysokiej rozdzielczości u rodzinnych dawców i biorców (podobnie jak standardowo jest to wykonywane w przypadku doboru dawców niespokrewnionych) być może pozwoliłoby na wykrycie istniejących niezgodności allelicznych, a przez to zwiększyłoby szanse na lepszy dobór, co mogłoby implikować mniejszym odsetkiem powikłań poprzyszczepowych i poprawić jakość życia biorców.

Badania biomolekularne wysokiej rozdzielczości przechowywanych próbek DNA par rodzeństwa dobranego na podstawie typowania niskiej rozdzielczości nie ujawniło jednak obecności niezgodnych alleli HLA. Ciężka GVHD odpowiedzialna za niepomyślny przebieg potransplantacyjny może wystąpić pomimo pełnego dopasowania 10/10 alleli HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, co tym samym oznacza, że inne czynniki są odpowiedzialne za występowanie tego powikłania.

Według dostępnych danych literaturowych o czynnikach wciąż badanych, genetycznie uwarunkowanych i niezwiązanych z doбором antygenowym w HLA między dawcą i biorcą, a mogących wpływać na wyniki allogenicznych przeszczepień komórek krwiotwórczych, zalicza się polimorfizm genów: NOD2/CARD15 oraz genów, których produktami ekspresji są cytokiny: TNF-alfa, IL-10, IL-6, IFN-gamma, IL-1 i TGF-beta (6).

Do znanych i ciągle badanych czynników, które w zależności od polimorfizmu kodujących je genów mogą mieć różną ekspresję u dawcy i biorcy, a przez to wpływać na wyniki alloprzeszczepień, należą między innymi słabe antygeny zgodności tkankowej (7).

Stały postęp badań immunogenetycznych i dynamiczny rozwój transplantologii z pewnością przyczynią się do poznania nowych czynników immunogenetycznych wpływających na wyniki przeszczepień, co umożliwi wypracowanie i podjęcie wysiłków zmierzających do zapobiegania i leczenia powikłań, a tym samym do poprawy odległych wyników transplantacji.

WNIOSKI

Standardowe procedury stosowane w doborze dawcy spośród rodzeństwa są wystarczające i wiarygodne, chociaż nie mogą one zagwarantować wykluczenia obecności niezgodnych alleli HLA.

PIŚMIENNICTWO

1. Nowak J, Fabijańska-Mitek J: Podstawy immunogenetyki transplantacyjnej. Biblioteka Diagnostyki Laboratoryjnej. Fundacja Pro Farmacia Futura, Warszawa 2012: 72-81.
2. Bogunia-Kubik K (red.): Badania immunogenetyczne w transplantologii i diagnostyce. Wydawnictwo I-BIS S.C., Wrocław 2012: 9-20.
3. Apperley J, Maszi T: Graft-versus-host disease. [In:] Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Maszi T (eds.): Haematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook. 6 ed., 2012: 216-233.
4. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T: Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013: 425-449.
5. Szczekliki A (red.): Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na 2011. Medycyna Praktyczna, Kraków 2011: 1683-1690.
6. Shaw BE, Madríguez A: Immunogenetics of allogeneic HSCT. [In:] Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Maszi T (eds.): Haematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook. 6 ed., 2012: 74-89.
7. Dzierżak-Mietła M, Markiewicz M, Siekiera U et al.: Occurrence and impact of minor histocompatibility antigens' disparities on outcomes of hematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. Biological and Genetic Aspects of Donor-Recipient Matching in HSCT. Bone Marrow Research 2012, Article ID 257086, 1-12. doi:10.1155/2012/257086.

otrzymano/received: 07.04.2015
zaakceptowano/accepted: 30.04.2015