

©Borgis

*Patrycja Zielińska, Agata Wieczorkiewicz-Kabut, Monika Dzierżak-Mietła, Krzysztof Białas, Anna Kocłęga, Krystyna Jagoda, Agnieszka Karolczyk, Grzegorz Helbig, Sławomira Kyrzcz-Krzemień

Ocena populacji mieszanej erytrocytów (chimerizmu erytrocytów) metodą cytometrii przepływowej u pacjentów po allogenicznnej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych**

Analysis of mixed population of erythrocytes (chimerism of erythrocytes) by flow cytometry in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Klinika i Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
p.o. Kierownika Kliniki: prof. dr hab. med. Grzegorz Helbig
Lekarz Kierujący Oddziałem: prof. dr hab. med. Sławomira Kyrzcz-Krzemień

Słowa kluczowe

cytometria przepływowa, przeszczepienie allogeniczne krwiotwórczych komórek macierzystych, niezgodność grup krwi

Keywords

flow cytometry, allogeneic stem cell transplantation, blood group incompatibility

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

Adres/address:

*Patrycja Zielińska
Klinika i Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Dąbrowskiego 25, 40-032 Katowice
tel. +48 (32) 259-12-81
patrycja.zielinska@interia.pl

**Praca została sfinansowana w ramach pracy statutowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (nr KNW-1-089/K/3/0 oraz nr KNW-092/K/4/0).

Streszczenie

Wstęp. Cytometria przepływowa (FC) to nowoczesna metoda badawcza i diagnostyczna, umożliwiająca diagnostykę jakościową i ilościową różnych populacji komórek.

Cel pracy. Ocena chimerizmu erytrocytów u pacjentów po alloprzeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych w przypadku dużej niezgodności grup krwi pomiędzy dawcą i biorcą.

Materiał i metody. Grupę badaną stanowiło łącznie 65 dorosłych pacjentów poddanych allogenicznnej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w latach 2012-2014. Materiał stanowiła krew obwodowa pobrana do rutynowego oznaczenia morfologii krwi, w ilości od 100 do 250 μ l. Badanie oceny chimerizmu erytrocytów zostało przeprowadzone w dobie +30., a następnie 2, 3, 6, 9 i 12 miesięcy po alloHSCT w podgrupie chorych z dużą niezgodnością grup krwi.

Wyniki. Wśród badanej podgrupy chorych ($n = 33$) z dużą niezgodnością grup krwi mediana wartości chimerizmu erytrocytów u większości chorych z prawidłowo przebiegającym wszczepieniem linii erytroblastycznej wynosiła: w dobie +30. – 7% (zakres: 0,2-15,1%), 2 miesiące po alloHSCT – 34,7% (zakres: 16,2-45,5%), 3 miesiące po przeszczepieniu – 87% (zakres: 79,1-97,2%), w kolejnych punktach pomiarowych odpowiednio mediany wynosiły: 95,3% (zakres: 85,2-99,1%), 98,7% (zakres: 86,6-99,7%) i 98,8% (zakres: 89,4-99,8%). Jedynie u 3 chorych z dużą niezgodnością grup krwi stwierdzono brak erytrocytów dawcy we krwi obwodowej chorego, co w dalszej obserwacji doprowadziło do rozwoju aplazji czystoczerwokrwinkowej u tych chorych.

Wnioski. W przypadku oceny erytrocytów po allogenicznnej transplantacji cytometria przepływowa jest narzędziem prostym oraz stosunkowo mało czasowo- i kosztochłonnym, pozwalającym w szybki sposób monitorować wszczep linii erytroblastycznej w przypadku transplantacji z dużą niezgodnością grup krwi pomiędzy dawcą i biorcą.

S u m m a r y

Introduction. Flow cytometry (FC) is a modern research and diagnostic technique, that allows qualitative and quantitative assessment of different cell populations.

Aim. Assessment of chimerism of erythrocytes in patients after allogeneic stem cell transplantation with major blood group incompatibility.

Material and methods. The group of 65 patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Medical University of Silesia, Katowice, in years 2012-2014 was included in the study. Peripheral blood collected for routine blood count in the amount of 100-250 μ l

was used. The assessment of erythrocyte chimerism was performed in day +30 after alloHCT and then 2, 3, 6, 9 and 12 months after transplantation in the subgroup of patients with major blood group incompatibility.

Results. Among the subgroup of patients with major blood group mismatch ($n = 33$) and normal engraftment of erythroblastic line, median erythrocyte chimerism was found to be: 7% (range: 0.2-15.1%) in day +30, 34.7% (range: 16.2-45.5%) 2 months after alloHCT, 87% (range: 79.1-97.2%) 3 months after the procedure, in the next time points the median values were as follows: 95.3% (range: 85.2-99.1%), 98.7% (range: 86.6-99.7%) and 98.8% (range: 89.4-99.8%). Only 3 patients with major blood group mismatch were found to have no donor erythrocytes in their peripheral blood, which resulted in the development of pure red cell aplasia in these cases.

Conclusions. Flow cytometry can be used after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as an easy, reliable, not time and cost-consuming method to evaluate the engraftment of erythroblastic line in patients with major blood group incompatibility.

WSTĘP

Allogeniczna transplantacja krwiotwórczych komórek macierzystych (ang. *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* – alloHCT) to metoda dająca szansę na wyleczenie u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego. Procedura ta może być przeprowadzona również w przypadku niezgodności grup krwi pomiędzy dawcą a biorcą, gdyż antygeny zgodności tkankowej są dziedziczone w sposób niezależny od antygenów grupowych erytrocytów. Obecnie niemal połowa wszystkich procedur przeszczepowych jest wykonywana w przypadku niezgodności grup krwi. Odmiennie wygląda to w przeszczepieniach narządów litych, gdzie zgodność grup krwi w parze dawca-biorca jest kluczową kwestią. Stwierdzono, że w przypadku niezgodności grup krwi częściej dochodzi do hemolizy, która objawia się natychmiast podczas przeszczepienia lub też dopiero podczas regeneracji układu krwiotwórczego, jak również częściej obserwuje się opóźnienie lub brak wszczepu linii erytroblastycznej. Powikłania hemolityczne znacznie częściej pojawiać się mogą po przeszczepieniach krwiotwórczych komórek macierzystych szpiku, co związane jest z zanieczyszczeniem materiału przeszczepowego przez erytrocyty i/lub osocze. Szacuje się, że w około 3-29% przypadków może wystąpić aplazja czystoczerwono krwinkowa (ang. *pure red cell aplasia* – PRCA) (1-3).

Dostępne dane w piśmiennictwie nie wskazują w sposób jednoznaczny na niekorzystny wpływ niezgodności grup krwi na całkowite przeżycie biorców (ang. *overall survival* – OS) czy śmiertelność niezwiązaną z nawrotem (ang. *non-relapse mortality* – NRM), jak również rozwój choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease* – GVHD) oraz przeżycie wolne od choroby (ang. *disease free survival* – DFS) (1-4).

W celu monitorowania i/lub zapobieżenia wystąpieniu powyższych powikłań kluczowym wydaje się odpowiednie monitorowanie wszczepu linii erytroblastycznej we wczesnym okresie poprzyszczepowym u pacjentów przeszczepianych od dawców o innej grupie krwi. Wyróżnia się dużą i małą niezgodność grup krwi oraz tzw. dwukierunkową (ang. *bidirectional*). Duża niezgodność grup krwi, występująca w około 20-25% przypadków, ma miejsce, gdy na erytrocytach dawcy są obecne antygeny niewystę-

pujące u biorcy, a pacjent posiada izohemaglutyniny skierowane przeciwko tym antygenom. Duża niezgodność występuje między dawcą grupy A, B lub AB oraz biorcą grupy 0. Gdy w materiale przeszczepowym obecne są krwinki czerwone, izohemaglutyniny biorcy mogą je związać, powodując gwałtowną hemolizę. Ponadto mogą też wpłynąć na opóźnienie wszczepienia linii erytroblastycznej lub rozwój aplazji czystoczerwono krwinkowej, będącej wynikiem produkcji izohemaglutynin przez resztkowe limfocyty B i plazmocyty pacjenta.

O małej niezgodności grup krwi, która również stanowi około 20-25% przypadków, mówimy w sytuacji odwrotnej, tzn. gdy dawca posiada izohemaglutyniny skierowane przeciwko odpowiednim antygenom grupowym na erytrocytach pacjenta. Sytuacja taka występuje między dawcą grupy 0 a biorcą grupy A, B lub AB oraz między dawcą grupy A lub B a biorcą grupy AB. Bierny transfer tych przeciwciał może skutkować ostrą hemolizą u chorego, zwłaszcza przy wysokim mianie przeciwciał u dawcy. Może również wystąpić opóźniona hemoliza jako skutek tzw. *passenger lymphocyte syndrome*, czyli zespołu limfocytów pasażerskich.

Możliwe jest też występowanie małej i dużej niezgodności grup krwi jednocześnie (gdy dawca ma grupę A, a biorca grupę B lub odwrotnie), czyli gdy zarówno dawca, jak i biorca posiadają przeciwciała skierowane przeciwko antygenom grupowym odpowiednio u dawcy/biorcy, jednak taka sytuacja ma miejsce jedynie w około 5% przypadków. Potencjalne powikłania są podobne jak opisane dla dużej i małej niezgodności grup krwi.

Uważa się, że niezgodność w zakresie czynnika Rh nie wpływa istotnie na przebieg okresu okołoprzszczepowego u pacjenta.

Po około 3 miesiącach po przeszczepieniu chory powinien zmienić grupę krwi na grupę krwi dawcy. Największe ryzyko poważnych powikłań występuje w przypadku dużej niezgodności grup krwi i jest najwyższe we wczesnym okresie poprzyszczepowym, czyli do 3 miesięcy po transplantacji.

CEL PRACY

Praca prezentuje zastosowanie cytometrii przepływową (ang. *flow cytometry* – FC) w celu określenia chimerizmu erytrocytów po przeszczepieniu allogenicznych

krwiotwórczych komórek macierzystych w przypadku niezgodności grup krwi pomiędzy dawcą i biorcą.

MATERIAŁ I METODY

Grupę badaną stanowiło łącznie 65 dorosłych pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach w latach 2012-2014. Wskazaniami do procedury alloHSCT były ostra białaczka limfoblastyczna oraz ostra białaczka szpikowa i zespół mielodysplastyczny. Chorzy zostali poddani leczeniu kondycjonującemu mieloablacyjnemu (32 pacjentów) oraz niemeloablacyjnemu (33 osoby). Od dawcy rodzinnego komórki przyjęło 13 chorych, natomiast od dawcy niespokrewnionego – 52 pacjentów. Wśród grupy badanej 13 dawców wykazywało niezgodność antygenową bądź alleliczną z biorcą w zakresie antygenów HLA. Źródłem komórek macierzystych była krew obwodowa we wszystkich przypadkach. Wśród badanej grupy 15,6% (24 przypadki) stanowiły transplantacje z dużą niezgodnością grup krwi pomiędzy dawcą i biorcą, natomiast 5,85% (9 przypadków) pary biorca-dawca z dużą i małą niezgodnością grup krwi. U większości chorych (łącznie 38 chorych) stosowano standardowe leczenie immunosupresyjne (tj. metotreksat w dobie +1., +3. oraz +6. oraz cyklosporynę początkowo dożylnie, a następnie doustnie w dawkach modyfikowanych w zależności od stężenia leku we krwi). U pozostałych chorych w leczeniu immunosupresyjnym stosowano mykofenolan mofetilu od doby -1., również początkowo dożylnie, a następnie doustnie. W przypadku przeszczepień od dawców niespokrewnionych stosowano surowicę antylimfocytarną w dawce 15 mg/kg przez 3 kolejne dni poprzedzające transplantację lub surowicę antytymocytarną (Thymoglobuline) w dawce 7,5 mg/kg (u 4 chorych). Dodatkowo stosowano profilaktyczne leczenie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybicze, a także wspomagające, w zależności od sytuacji klinicznej. W okresie regeneracji i w trakcie opieki ambulatoryjnej monitorowano też reaktywację wirusa CMV metodą PCR u pacjentów. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli 1.

Materiał stanowiła krew obwodowa pobrana do rutynowego oznaczenia morfologii krwi, w ilości od 100 do 250 μ l. Badanie oceny chimeryzmu erytrocytów zostało przeprowadzone w dobie +30., a następnie 2, 3, 6, 9 i 12 miesięcy po alloHSCT w podgrupie chorych z dużą oraz małą i dużą niezgodnością grup krwi.

Do badania wykorzystano przeciwciała monoklonaalne wykorzystywane do rutynowego oznaczania grup krwi w układzie AB0. Przed inkubacją z przeciwciałami monoklonalnymi (PcMo) erytrocyty były wstępnie utrwalane 0,1% glutaraldehydem w PBS (roztworze soli fizjologicznej). Utrwalanie erytrocytów miało na celu zablokowanie zdolności do aglutynowania erytrocytów przez I PcMo. Następnie, po dwukrotnym przepłukaniu PBS, próbkę inkubowano najpierw z I PcMo anty-A, anty-B lub anty-D, potem z II PcMo wykrywa-

Tab. 1. Charakterystyka pacjentów

Charakterystyka	Liczba
Diagnoza podstawowa: ostra białaczka szpikowa zespół mielodysplastyczny ostra białaczka limfoblastyczna	50 5 10
Płeć pacjenta: kobieta mężczyzna	30 35
Wiek pacjenta, mediana (zakres)	35 (19-67)
Dawca: zgodny dawca rodzinny zgodny dawca niespokrewniony (10/10) niezgodny dawca niespokrewniony (9/10)	13 39 13
Niezgodność grup krwi: duża mała dwukierunkowa	N = 45 24 12 9
Leczenie kondycjonujące: mieloablacyjne (MAC) niemeloablacyjne (RIC)	32 33
Źródło komórek macierzystych: krew obwodowa	65
Wiek dawcy, mediana (zakres)	23 (19-49)
Płeć dawca-biorca: kobieta – dawca/mężczyzna – biorca inne	19 46
Status CMV dawca-biorca: pozytywny-negatywny pozytywny-pozytywny negatywny-negatywny	17 40 8

jącym obecność I PcMo na erytrocytach, sprzężonym z fluoresceiną. Do barwienia erytrocytów zastosowano metodę immunofluorescencji pośredniej ze względu na brak PcMo wykrywających antygeny grupowe – bezpośrednio znakowanych fluorochromami. Wyznakowane erytrocyty były analizowane na cytometrze przepływowym FACSCanto II firmy Becton Dickinson, na którym oceniano odsetek erytrocytów mających antygen A, B oraz ew. D (w zależności od grupy krwi dawcy i biorcy). W niektórych przypadkach, gdy niezgodność dotyczyła np. równocześnie układu AB0 i Rh, możliwa była ocena odsetka erytrocytów biorcy, dawcy oraz – dodatkowo przetwarzanych w okresie okołoprzeszczepowym lub w przedłużającej się aplazji czerwonych krwinek – erytrocytów innych dawców. Wynik podawano w postaci odsetka erytrocytów posiadających dany antygen: A, B lub D.

Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (nr KNW/0022/KB1/123/11 oraz nr KNW/0022/KB1/100/14).

WYNIKI

W badanej grupie 65 chorych mediana przeszczepionych komórek CD34 dodatnich wynosiła $4,76 \times 10^6$ /kg masy ciała (zakres: 1,7-11,91). Mediana czasu regeneracji neutrofilii $> 500/\mu$ L wynosiła 13 dni (zakres: 12-28 dni). Mediana czasu regeneracji płytek krwi $> 50\ 000/\mu$ L – 16 dni (zakres: 11-24), jed-

nak u 7 chorych wartości płytek krwi nie spadły poniżej 20 000/ μ L. Do doby +30. po alloH SCT żaden pacjent nie otrzymywał granulocytowego czynnika wzrostu.

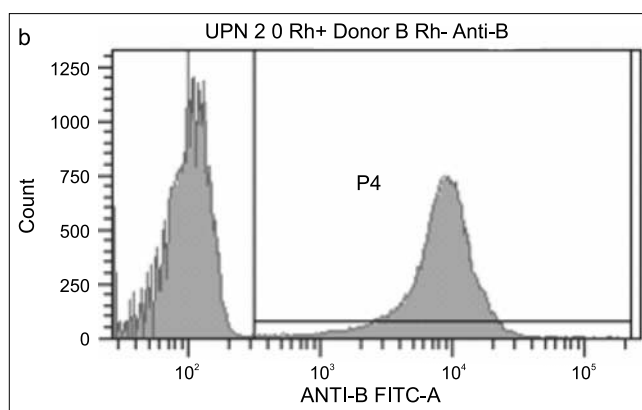
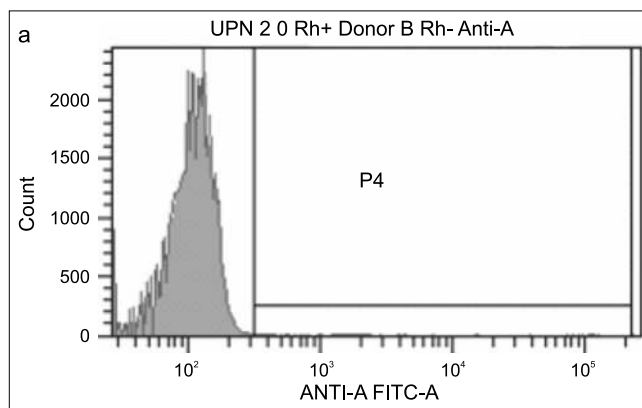
Szczegółową analizą objęto chorych z niezgodnością grup krwi pomiędzy dawcą a biorcą. Wśród podgrupy chorych z dużą lub dwukierunkową niezgodnością grup krwi (łącznie 33 chorych) oceniano chimeryzm erytrocytów w dobie +30. po alloH SCT, następnie 2, 3, 6, 9, i 12 miesięcy po alloH SCT.

Spośród badanej podgrupy 33 chorych w czasie roku obserwacji zmarło 7 pacjentów: 3 z powodu powikłań infekcyjnych (w dwóch przypadkach zapalenie płuc najprawdopodobniej o etiologii grzybiczej, w 1 przypadku krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego o etiologii wirusowej), 4 – z powodu sterydoopornej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (w 3 przypadkach z zajęciem głównie układu pokarmowego, w 1 przypadku zajęcie układu pokarmowego i wątroby).

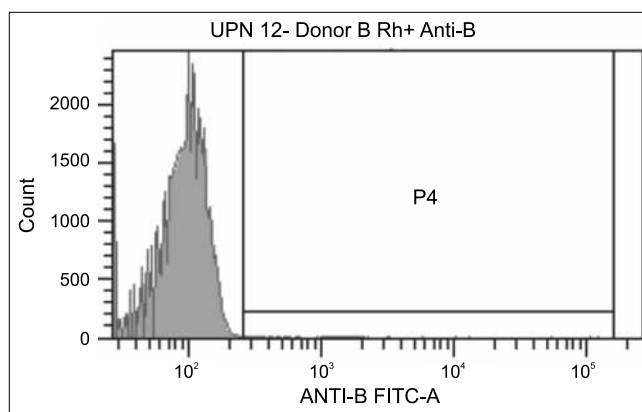
Wśród tej podgrupy chorych mediana wartości chimeryzmu erytrocytów w dobie +30. wynosiła 7% (zakres: 0,2-15,1%), 2 miesiące po alloH SCT – 34,7% (zakres: 16,2-45,5%), 3 miesiące po przeszczepieniu – 87% (zakres: 79,1-97,2%), w kolejnych punktach pomiarowych odpowiednio mediany wynosiły: 95,3% (zakres: 85,2-99,1%), 98,7% (zakres: 86,6-99,7%) i 98,8% (zakres: 89,4-99,8%). Wyniki przedstawiono w tabeli 2. W opisywanej grupie chorych mediana dni do regeneracji układu erytoblastycznego wynosiła 13 dni (zakres: 9-17).

Ocena chimeryzmu erytrocytów opierała się na założeniu, że w okresie okołotransplantacyjnym pacjenci wymagający substytucji koncentratu krwinek czerwonych mieli prowadzoną substytucję składnikiem krwi grupy 0. W związku z powyższym można zidentyfikować erytrocyty krwi grupy dawcy (ryc. 1).

W badanej podgrupie chorych, u 3 pacjentów nie zaobserwowano prawidłowej rekonstrukcji układu erytoblastycznego, co – w dalszej obserwacji – doprowadziło do rozwoju aplazji czystoczerwonokrwinkowej (PRCA) u tych chorych. Rozpoznanie to zostało potwierdzone w badaniu histopatologicznym szpiku. U tych chorych stwierdzono też bardzo niski odsetek retikulocytów w okresie regeneracji układu krwiotwórczego oraz utrzymującą się zależność od przetoczeń w dobie +30. po alloH SCT. U dwóch pacjentów nie zidentyfikowano populacji erytrocytów dawcy w badaniu chimeryzmu erytrocytów w dobie +30. po alloH SCT (ryc. 2). U trzeciego chorego zaobserwowano spadek chimeryzmu erytrocytów dawcy 3 miesiące po alloH SCT.



Ryc. 1a, b. Histogram przedstawiający populację erytrocytów dawcy 2 miesiące po alloH SCT (UPN 2). Ocena krwinek czerwonych grupy 0 (biorcy i pochodzących z transfuzji) oraz grupy B (dawcy) za pomocą cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti-A (a) oraz anti-B (b)



Ryc. 2. Histogram obrazujący brak krwinek czerwonych grupy B (pochodzących od dawcy) w dobie +30. po alloH SCT (UPN 12)

W każdym z tych przypadków, po wykluczeniu ła wirusowego (m.in. zakażenie parwowirusem B19), zastosowano stopniową redukcję leków

Tab. 2. Chimeryzm erytrocytów w poszczególnych punktach czasowych po alloH SCT w podgrupie chorych z dużą oraz dużą i małą niezgodnością grup krwi między dawcą i biorcą u pacjentów z prawidłową rekonstrukcją układu erytoblastycznego

Pacjenci (N = 30)	Chimeryzm erytrocytów (% erytrocytów dawcy) we krwi obwodowej chorego					
	dobę +30. po alloH SCT (%)	+2 mies. po alloH SCT (%)	+3 mies. po alloH SCT (%)	+6 mies. po alloH SCT (%)	+9 mies. po alloH SCT (%)	+12 mies. po alloH SCT (%)
	N = 30	N = 28	N = 24	N = 24	N = 24	N = 24
	7 (0,2-15,1)	34,7 (16,2-45,5)	87 (79,1-97,2)	95,3 (85,2-99,1)	98,7 (86,6-99,7)	98,8 (89,4-99,8)

immunosupresyjnych, podjęto też próbę dożylnych wlewów immunoglobulin, iniekcji erytropoetyny oraz w dwóch przypadkach – zastosowano zabiegi plazmaferezy. W międzyczasie chorzy wymagali substytucji preparatami koncentratu krwinek czerwonych. Poprawa w zakresie uniezależnienia od transfuzji wystąpiła po medianie 2 miesięcy od rozpoczęcia leczenia u dwóch chorych. Trzeci pacjent zmarł wskutek powikłań infekcyjnych 4 miesiące po przeszczepieniu.

DYSKUSJA

Antygeny zgodności tkankowej (HLA) oraz antygeny grup krwi układu AB0 są kodowane przez różne geny, stąd niezgodność między potencjalnymi dawcami krwiotwórczych komórek hematopoetycznych a biorcami w obrębie grup krwi. Szacuje się, że około 15-25% rodzinnych dawców krwiotwórczych komórek macierzystych wykazuje niezgodność grup krwi (2, 5). Odsetek ten wydaje się być większy w przypadku dawców alternatywnych. Jednakże wpływ niezgodności grup krwi na długofalowe wyniki alloprzeszczerpień pozostaje kontrowersyjny (1-3). Udowodniono jednak, że występowanie aplazji czystoczerwonokrwinkowej i opóźnienie wszczepu linii erytroblastycznej częściej występuje w przypadkach dużej niezgodności grup krwi w parach dawca-biorca i wiąże się z potrzebą transfuzji koncentratu krwinek czerwonych, co wpływa na stężenie ferrytyny i zwiększa ryzyko śmiertelności poprzyszczepowej (3). Nie udowodniono związku pomiędzy niezgodnością grup krwi przed alloHSCT a ryzykiem odrzucenia przeszczepu czy rozwojem choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (1, 3, 5). Jednakże zaleca się wybór dawcy zgodnego w grupie krwi, jeśli jest taka możliwość, a także transfuzję erytrocytów o odpowiedniej grupie krwi (w przypadku dużej niezgodności jest to zawsze grupa krwi 0) oraz leczenie chelatujące, celem zminimalizowania ryzyka aplazji czystoczerwonokrwinkowej oraz poprawy wyników przeszczepień. W naszym Ośrodku, w przypadku dużej niezgodności grup krwi między dawcą i biorcą krwiotwórczych komórek hematopoetycznych ze szpiku wykonuje się zwykle procedurę separacji erytrocytów dawcy z materiału przeszczepowego (6). Natomiast w przypadku małej niezgodności grup krwi najczęściej stosuje się odwirowanie osocza z materiału przeszczepowego uzyskanego ze szpiku. W rzadkich przypadkach transplantacji komórek macierzystych pobranych ze szpiku, gdy mamy do czynienia z małą i dużą niezgodnością grup krwi, wykonywane jest jedynie odwirowywanie osocza (5, 6). W chwili obecnej, przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych ze szpiku są procedurą marginalną, znakomitą większość stanowią komórki macierzyste krwi obwodowej po stymulacji granulocytowym czynnikiem wzrostu. W przypadku tego materiału przeszczepowego, z uwagi na niskie zanieczyszczenie erytrocytami, nie ma potrzeby inżynierii. W trakcie procedury aferezy osocze

jest osobno separowane, co również minimalizuje ryzyko kontaminacji.

Jednak wciąż dochodzi u pacjentów do powikłań wynikających z różnicy grup krwi pomiędzy dawcą a biorcą, co skłania do monitorowania wszczepu linii erytroblastycznej. Przedstawiona metoda wykorzystująca cytometrię przepływową wydaje się spełniać wszelkie warunki wiarygodnego, szybkiego i relatywne taniego testu diagnostycznego.

Cytometria przepływową to nowoczesna metoda diagnostyczna z coraz większym zakresem wskazań do jej zastosowania. Cytometria przepływową w badaniach krwinek czerwonych zastosowana została po raz pierwszy w 1980 roku u pacjentów z niedokrwistością autoimmunohemolityczną (7). Później za pomocą FC wykrywano krwinki płodu w krążeniu matki, wykorzystano tą metodę również w badaniach antygenów grup krwi, w tym ekspresji antygenów układu Rh w zależności od ich homo- lub heterozygotyczności (8, 9). Ponadto używano tej metody w ocenie sportowców stosujących nielegalne transfuzje, a także w badaniach przeżywalności krwinek w krążeniu biorcy (10).

Cytometria przepływową pozwala na badania fenotypowe, czyli wykrywanie i identyfikację antygenów krwinek czerwonych za pomocą skierowanych do nich swoistych przeciwciał oraz ocenę mieszanych populacji erytrocytów (8, 9). Jest dynamicznie rozwijającą się techniką diagnostyczną, umożliwiającą precyzyjną ocenę pojedynczych komórek przy jednoczesnej analizie dużej ich liczby. W cytometrze kolejno na poszczególne krwinki pada wiązka światła laserowego, umożliwiając zróżnicowanie poszczególnych frakcji za pomocą następujących parametrów morfologicznych: wielkości FSC (ang. *forward scatter channel*) i ziarnistości SSC (ang. *side scatter channel*). W celu wykrycia poszukiwanego antygeny znakuje się erytrocyty specyficznymi przeciwciałami, sprzężonymi z odpowiednimi fluorochromami: najczęściej są nimi fikoerytryna (PE) oraz izotiocyanian fluoresceiny (FITC). Barwniki te wzbudzone są przez laser argonowy i emitują odpowiednio światło barwy pomarańczowej bądź zielonej (8, 9). Intensywność fluorescencji odpowiada ekspresji antygeny na danej komórce. Zależy ona jednak nie tylko od liczby miejsc antygenowych na komórce, ale także od: stopnia powinowactwa użytego przeciwciała, czyli siły jego wiązania z determinantami antygenowymi, metody znakowania komórek (bezpośrednia ze znakowanymi swoistymi przeciwciałami lub pośrednia ze znakowanymi przeciwciałami anti-IgG skierowanymi do swoistych nieznakowanych przeciwciał) oraz zastosowania odpowiednich fluorochromów. Różnorodność barwników umożliwia dobór odpowiedniej siły świecenia w zależności od gęstości badanego antygeny i zgodnie z zasadą, że do wyznakowania niezbyt licznych struktur o małej gęstości determinant antygenowych stosuje się silne fluorochromy i odwrotnie – dla dużej ich liczby stosuje się fluorochromy słabe.

Cytometria przepływowa jest idealnym narzędziem do monitorowania wszczepu linii czerwonych krwi. W ciągu paru godzin jesteśmy w stanie z dużą czułością i specyficzną określić źródło erytrocytów we krwi obwodowej chorego i ew. podjąć działania mające na celu poprawę funkcjonowania wszczepu poprzez m.in. redukcję dawek leków immunosupresyjnych, podawanie erytropoetyny, plazmaferezy. Przedstawione badania wykazały, że metodą cytometrii przepływowej jesteśmy w stanie w prosty, praktycznie bezinwazyjny sposób monitorować chorych najbardziej zagrożonych rozwojem powikłań związanych z wszczepem linii czerwonych krwi, czyli pacjentów poddanych procedurze allogenicnej transplantacji z dużą niezgodnością grup krwi.

WNIOSKI

Cytometria przepływowa pozwala z dużą czułością i specyficzną wyodrębnić poszczególne populacje komórkowe. W przypadku oceny erytrocytów po allogenicnej transplantacji jest narzędziem prostym oraz stosunkowo mało czasochłonnym, pozwalającym w szybki sposób monitorować wszczep linii erytroidalnej w przypadku transplantacji z dużą niezgodnością grup krwi pomiędzy dawcą i biorcą. Rozwój aplazji czerwonych krwi jest częstszy w przypadku istniejących niezgodności w grupach krwi dawca-biorca. Jednak szybka diagnostyka tego powikłania oraz wczesne podjęcie leczenia mogą wpłynąć korzystnie na stan kliniczny chorego.

PIŚMIENNICTWO

1. Booth GS, Gehrie EA, Bolan CD, Savani BN: Clinical guide to ABO-incompatible allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19: 1152-1158.
2. Kimura F, Sato K, Kobayashi S et al.: Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica* 2008; 93(11): 1686-1693.
3. Worel N: ABO-Mismatched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Hemother* 2016; 43(1): 3-12.
4. Ozkurt ZN, Yegin ZA, Yenicesu I et al.: Impact of ABO-incompatible donor on early and late outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41(9): 3851-3858.
5. Stussi G, Halter J, Bucheli E et al.: Prevention of pure red cell aplasia after major or bidirectional ABO blood group incompatible hematopoietic stem cell transplantation by pretransplant reduction of host anti-donor isoagglutinins. *Haematologica* 2009; 94(2): 239-248.
6. Daniel-Johnson J, Schwartz J: How do I approach ABO-incompatible hematopoietic progenitor cell transplantation? *Transfusion* 2011; 51: 1143-1149.
7. Van der Meulen FW, de Bruin HG, Goosen PC et al.: Quantitative aspects of the destruction of red cells sensitized with IgG1 autoantibodies: An application of flow cytometry. *Br J Haematol* 1980; 46: 47-56.
8. Arndt PA, Garratty G: Flow cytometric analysis in red blood cell immunology. *Transfus Med Hemother* 2003; 31: 163-174.
9. Brown M, Wittwer C: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46: 1221-1229.
10. Arndt PA, Kumpel BM: Blood doping in athletes-detection of allogeneic blood transfusions by flow cytometry. *Am J Hematol* 2008; 83: 657-667.

otrzymano/received: 21.03.2017
zaakceptowano/accepted: 26.07.2017