

Nocna napadowa hemoglobinuria w świetle najnowszych doniesień

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the light of recent reports

Agnieszka Wróbel

Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Zakład Immunologii Hematologicznej
i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*) jest rzadko występującą (ok. 1,3/1 000 000/rok), ale ciężką i zagrażającą życiu chorobą [1–3]. Powstaje w wyniku somatycznej mutacji genu *PIG-A* (*phosphatidylinositol glycan-class A*) w wielopotencjalnej komórce krwiotwórczej i objawia się między innymi ciężką i przewlekłą hemolizą krwinek czerwonych chorego. Gen *PIG-A* koduje jeden z enzymów odpowiedzialnych za syntezę kotwicy glikozylfosfatydylowej (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*) w błonie komórkowej. Skutkiem nieobecności lub niewłaściwej budowy kotwicy GPI jest brak lub niedobór wielu białek powierzchniowych, w tym CD55 (DAF, *decay accelerating factor*) i CD59 (MIRL, *membrane inhibitor of reactive lysis*), które w prawidłowych warunkach odpowiadają za ochronę komórek przed działaniem układu dopełniacza. Wskutek mutacji genu *PIG-A* na poziomie komórki macierzystej brak ekspresji lub obniżona ekspresja białek CD55 i CD59, jak również pozostałych białek powiązanych z błoną komórkową poprzez kotwicę GPI, dotyczy nie tylko erytrocytów, lecz także innych komórek krwi, między innymi granulocytów, monocytów i płytek. Najważniejsze znaczenie kliniczne w przebiegu PNH ma jednak hemoliza erytrocytów [4, 5].

W związku z szybko postępującym rozwojem wiedzy na temat patogenezы i następstw klinicznych PNH konieczne jest usprawnienie i unowocześnienie jej diagnostyki. Przedstawienie najnowszych wytycznych dotyczących wykrywania choroby

i dyskusja na ten temat były jednym z głównych tematów 11th *Euroconference on Clinical Cell Analysis*, która odbyła się w dniach 14–17 września 2011 roku w Dublinie. Konferencję poprzedzał dwudniowy 7th *European Course on Clinical Cytometry*, podczas którego jedną z sesji ćwiczeniowych poświęcono w całości praktycznym problemom związanym z diagnostyką PNH.

Najciekawszym, w opinii autorki niniejszego sprawozdania, wykładem w ramach kursu była prelekcja Michaela J. Borowitza, autora pracy *Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry* [6]. Autor ten przedstawił najnowsze wytyczne dotyczące diagnostyki PNH za pomocą cytometrii przepływowej, która od lat 90. XX wieku jest uznawana za metodę z wyboru i „złoty standard” w rozpoznawaniu i monitorowaniu tej choroby. Zgodnie z międzynarodowym konsensusem przedstawionym w powyższej pracy badania w kierunku PNH powinno się przeprowadzać u chorych na anemię hemolityczną, u których wynik testu Coombsa jest ujemny, u pacjentów z przewlekłą i niewyjaśnioną hemolizą wewnątrznaczyniową z towarzyszącą hemoglobinurią i hemosyderynurią, u chorych z niewyjaśnioną niewydolnością szpiku oraz u pacjentów z niewyjaśnioną zakrzepicą żył głębokich, w tym żył wątrobowych (zespół Budd-Chiari), ośrodkowego układu nerwowego i zakrzepicą naczyń skórnych. Najlepszym materiałem do analizy w kierunku PNH jest krew pełna w ilości 1–3 ml

Adres do korespondencji: Agnieszka Wróbel, Pracownia Immunologii Leukocytów i Płytek Krwi, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, tel./faks: 22 349 66 15, e-mail: awrobel@ihit.waw.pl

pobrana na dowolny antykoagulant. Konieczne jest badanie obecności klonów z defektem typu PNH w co najmniej 2 populacjach komórek — obowiązkowo w granulocytach i pomocniczo na krwinkach czerwonych. Coraz częściej zaleca się także badanie klonu PNH na monocytach. W celu jak najbardziej dokładniejszej oceny wielkości klonów typu PNH na wszystkich populacjach komórek zaleca się stosowanie określonych odczynników i przeciwciał monoklonalnych swoiście reagujących z danymi liniami komórkowymi w zestawieniu z odczynnikami wykrywającymi klon typu PNH, czyli komórki pozbawione GPI. Zaleca się stosowanie następujących kombinacji odczynników do wykrywania klonu komórek z defektem typu PNH: dla erytrocytów — CD235a/CD59, dla granulocytów — FLAER/CD24/CD15/CD45, a dla monocytów — FLAER/CD14/CD64/CD45. Podkreśla się też duże znaczenie badań z użyciem aerolizyny znakowanej fluorochromem Alexa 488 (FLAER, *fluorescent labelled aerolysin*), którą niedawno wprowadzono do diagnostyki PNH. Jest to toksyna bakteryjna produkowana przez *Aeromonas hydrophila*. Ma ona zdolność wytwarzania porów w błonie komórek, co prowadzi bezpośrednio do ich lizy. W przypadku komórek z defektem typu PNH działanie to jest zahamowane. Ponadto FLAER swoiście łączy się z białkami kotwicy GPI, jest więc bardzo czułym markerem ich niedoboru lub braku [7]. Borowitz zwrócił ponadto uwagę na konieczność odpowiedniego przygotowania sprawozdania z badania w kierunku PNH — w raporcie należy wskazać, czy wykryto komórki z defektem typu PNH, a także podać odsetek klonów komórek zarówno z częściowym, jak i całkowitym niedoborem GPI oraz łączny odsetek obu typów klonów. Ważne jest również opisanie użytych w teście odczynników i przeciwciał. Niedopuszczalne jest natomiast określanie wyniku badania jako pozytywny bądź negatywny oraz nadinterpretacja obecności małych klonów jako dowodu istnienia PNH.

W sesji doniesień ustnych na uwagę zasługiwała prezentacja Movalii i Illingworth [8] dotycząca zastosowania techniki wysokoczułej cytometrii w diagnostyce PNH. Metoda ta charakteryzuje się czułością rzędu 0,01%, przy czułości metody rutynowo stosowanej równej około 1%. Aby wykryć przy jej użyciu małe klony komórek z defektem typu PNH, należy dokonać analizy cytometrycznej 250 000 zdarzeń dla wszystkich typów komórek. Natomiast według rutynowo stosowanych standardów wystarcza zliczenie już około 5000 zdarzeń. W odróżnieniu od diagnostyki rutynowej, w cytometrii wysokoczułej autorzy nie zalecają badania populacji monocytów, których jest zbyt mało we krwi ob-

wodowej. W celu przyspieszenia testu stosują też węższy panel odpowiednio wyselekcjonowanych odczynników i przeciwciał: dla erytrocytów — CD235a/CD59, dla granulocytów — CD15/FLAER/CD24/CD66b. Movalia i Illingworth badali obecność klonów typu PNH u 6607 chorych z podejrzeniem PNH. Wykazali, że wysokoczuła diagnostyka cytometryczna ma znaczenie w wykrywaniu choroby w niezaawansowanym stadium oraz że pozwala na dokładniejsze monitorowanie chorych oraz wczesne wdrożenie profilaktyki przeciwzakrzepowej i ewentualnego leczenia.

W innym doniesieniu w ramach sesji ustnej Kelly z Leeds podjął próbę odpowiedzi na pytanie, czy PNH jest chorobą klonalną czy oligoklonalną [9]. Problem ten pozostaje nierozwiązany, jako że u różnych osób wykrywa się albo klony pochodzące z jednej komórki macierzystej, albo z kilku tego typu komórek. W przypadku oligoklonalnej postaci PNH jeden z klonów często przyjmuje formę klonu dominującego. Wart uwagi jest też fakt, że pojedyncze komórki z defektem typu PNH są wykrywane nawet u osób zdrowych, nie ulegają one jednak kolejnym podziałom i wielkość klonu się nie zmienia.

Badacze z Kanady, Keeney i wsp. [10], zaprezentowali wyniki retrospektywnej analizy występowania klonów typu PNH u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym i anemią aplastyczną. Autorzy ci wykazali, że częstość występowania klonów typu PNH w tych chorobach jest niższa niż w doniesieniach innych badaczy, przy czym wynosi ona odpowiednio 50% przypadków (2/4) dla anemii aplastycznej i 3,92% (2/51) dla zespołu mielodysplastycznego. Istnienie klonów typu PNH u pacjentów z tymi chorobami wydaje się według autorów ważne, gdyż może świadczyć o immunologicznym podłożu niewydolności szpiku kostnego, a w konsekwencji wiązać się z lepszą odpowiedzią na leczenie immunosupresyjne.

W sesji doniesień ustnych Owaidah [11] z Arabii Saudyjskiej przedstawił doświadczenia krajów Zatoki Perskiej w badaniu i leczeniu PNH. W krajach tych diagnostyka i leczenie PNH są na najwyższym światowym poziomie — zarówno pod względem dostosowania się do najnowszych wytycznych dotyczących używanych odczynników i sprzętu, jak i dostępności najbardziej nawet kosztownych metod leczenia pacjentów, w tym do leczenia humanizowanym ludzkim przeciwciałem — ekulizumabem — przeciwko składowej C5 dopełniacza.

W sesji plakatowej zaprezentowano dwie prace na temat PNH. Plakat badaczy hiszpańskich [12] przedstawiał problematykę związaną z medycznymi wskazaniem do badania w kierunku PNH za

pomocą cytometrii przepływowej. Zespół przebadał ponad 271 osób, u których występowały kliniczne i laboratoryjne objawy choroby, takie jak: anemia, hemoglobinuria, pancytopenia i zakrzepica (175 osób; 65%), choroby towarzyszące (62 osoby; 23%) lub jedno i drugie jednocześnie (34 osoby; 12%). Klony komórek pozbawionych kotwicy GPI wykryto jedynie u 20 spośród 271 badanych osób (7%) oraz u 10 z 96 osób (10,4%) z uprzednio zdiagnozowanymi anemią aplastyczną i zespołem mielodysplastycznym. W kolejnym badaniu na obecność klonów typu PNH u tych samych chorych wykazano 88-procentową powtarzalność wyników.

Z kolei plakat zatytułowany *Assessment of fluorescent labelled aerolysin and a standard protocol for the detection of PNH cell populations*, autorstwa Whitby'ego i wsp. [13] z brytyjskiej organizacji NEQAS (*National External Quality Assessment Service*), potwierdził doniesienia na temat korzyści płynących z zastosowania w diagnostyce PNH wspomnianego już odczynnika FLAER. Zarówno metodą rutynową, jak i z użyciem wysokoczułej cytometrii autorzy porównali działanie FLAER i stosowanych rutynowo przeciwciał anti-CD66b, CD16 i CD24. Wyniki badań wykazały porównywalną czułość metody w przypadku wykorzystania obu rodzajów odczynników w metodzie rutynowej, udowodniły jednak znaczną przewagę FLAER przy zastosowaniu wysokoczułej cytometrii. Autorzy pracy zwrócili również uwagę na konieczność ujednolicenia protokołu badania w kierunku PNH w różnych laboratoriach.

Podsumowanie

W świetle przedstawionych doniesień okazuje się, że problem diagnostyki PNH wymaga dalszego opracowania i konsekwentnego wprowadzania w zajmujących się nią laboratoriach jednolitych procedur, zgodnych z najnowszymi wytycznymi.

Piśmiennictwo

- Hillmen P., Lewis S.M., Bessler M., Luzzato L., Dacie J.V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1253–1258.
- Hill A., Richards S.J., Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 2007; 137: 181–192.
- Brodsky R.A. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev.* 2008; 22: 65–74.
- Wilcox L.A., Ezzell J.L., Bernshaw N.J., Parker C.J. Molecular basis of the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood* 1991; 78: 820–829.
- Żupańska B., Konopka L., Bogdanik I., Pyl H. Utajony defekt typu nocnej napadowej hemoglobinurii. *Acta Haemat. Pol.* 2005; 36: 207–214.
- Borowitz M.J., Craig F.E., DiGiuseppe J.A. i wsp. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2010; 78: 211–230.
- Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J. i wsp. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2007; 72: 167–177.
- Movalia M., Illingworth A.J. Prevalence and follow-up of patients with PNH clones utilizing high sensitivity multiparameter flow cytometry. W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 55.
- Kelly R. Is PNH clonal or oligoclonal disorder? W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 46.
- Keeney M., Hsia C., Shih A.A., Hedley B., Chin-Yee I. Screening patients with myelodysplastic syndrome and aplastic anemia for PNH clones: a retrospective study. W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 55.
- Owaidah T. PNH testing: the experience of Gulf countries. W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 36.
- Perez-Andres M., Subira D., Sempere A. i wsp. Medical indications for PNH testing by flow cytometry. W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 79.
- Whitby L., Fletcher M., Whitby A. i wsp. Assessment of fluorescent labelled aerolysin and a standard protocol for the detection of PNH cell populations. W: ESCCA 2011, 7th European Course on Clinical Cytometry & 11th Euroconference on Clinical Cell Analysis. 2011: 72.