

Strokovni prispevek/Professional article

UGOTAVLJANJE IN SPREMLJANJE KLONA PNH Z DOLOČANJEM CD55 IN CD59 NA NEVTROFILCIH

DETECTION AND FOLLOW UP OF PNH CLONE BY MEASURING CD55 AND CD59 EXPRESSION ON NEUTROPHILS

Uroš Mlakar, Darja Žontar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-05; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 93-6

Ključne besede: *paroksizmalna nočna hemoglobinurija; aplastična anemija; pretočna citometrija*

Izvleček – Izhodišča. *Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je pridobljena klonška bolezen krvotvornih matičnih celic. Zanj je značilna intravaskularna hemoliza, odpoved kostnega mozga in nagnjenost k trombozam. Nastane zaradi somatske mutacije gena PIG-A. Ta je odgovoren za nastanek encima, ki sodeluje pri sintezi glikozilfosfatidilinozitol (GPI). Tako nastane klon krvnih celic, ki na površini nima tistih beljakovin, katerih vezavo omogoča GPI. Vrsto let se je za ugotavljanje PNH uporabljal Hamov preizkus, ki temelji na povečani dovzetnosti eritrocitov za litični učinek komplementa po dodatku kisline. Danes ugotavljamo PNH s pretočno citometrijo, kjer s protitelesi ugotavljamo pomanjkanje beljakovin, odvisnih od GPI. Prikazujemo naše izkušnje z uporabo tribarvne citometrije za ugotavljanje in oceno količine CD55/59 negativnih nevtrofilcev.*

Bolniki in metode. *Obravnavali smo devet bolnikov, ki smo jim že ugotovili PNH ali aplastično anemijo (6 s PNH in 3 z aplastično anemijo). Bolnikom smo v obdobju treh let merili velikost klona PNH z določanjem deleža CD55/59 negativnih nevtrofilcev. Velikost klona smo določali s tribarvno pretočno citometrijo, pri tem smo za ugotavljanje nevtrofilcev uporabili monoklonska protitelesa anti-DC15-PC5, za ugotavljanje beljakovin, odvisnih od GPI, pa anti-CD59-FITC in anti-CD55-PE.*

Rezultati. *Bolniki s hemolitično obliko PNH so imeli več kot 50% CD59/CD55 negativnih nevtrofilcev. Bolnik z največjim klonom je imel najbolj aktivno bolezen s pogostimi hudimi napadi hemolize. V triletnem obdobju smo pri dveh bolnikih opazovali postopno večanje klona PNH. Pri dveh bolnikih z remisijo PNH nismo ugotovili napake PNH. Trije bolniki z aplastično anemijo (hipoplastična PNH) so imeli <40% CD55/59 negativnih nevtrofilcev. Pri enem bolniku je prišlo do porasta klona PNH.*

Zaključki. *Tribarvna citometrija, pri kateri uporabljamo protitelesa anti-CD15/55/59, je primerna preiskava za ugotavljanje in oceno velikosti klona PNH. Ocena velikosti klona PNH ima klinično in prognostično vrednost. Od velikosti klona je odvisno tveganje za trombotične zaplete. Spremljanje*

Key words: *paroxysmal nocturnal haemoglobinuria; aplastic anaemia; flow cytometry*

Abstract – Background. *Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal haematopoietic stem cell disorder characterised by intravascular haemolysis, bone marrow failure and increased tendency to thrombosis. It is caused by a somatic mutation in the PIG-A gene, which encodes an enzyme essential for the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. The PIG-A mutation results in a clone of blood cells with total or partial deficiency of membrane proteins anchored to the cell surface through GPI anchor. For many years, an increased susceptibility of the PNH red cells to complement lysis in acidified serum (Ham's test) has been essential for diagnosis of the PNH. Current flow cytometric assays for PNH rely on the use of labeled antibodies to detect deficiencies of the specific GPI anchor proteins on blood cells. We evaluated a three-colour flow cytometry method for detection and quantification of CD55/59 negative neutrophils.*

Patients and methods. *Nine patients (6 with PNH and 3 with aplastic anaemia) who were previously diagnosed as having PNH or aplastic anaemia were evaluated. In the period of three years the patients were serially evaluated for the extent of PNH clone by quantification of CD55/59 negative neutrophils. Three-colour flow cytometry method was used for quantification of the CD55/CD59 negative neutrophils. We used directly conjugated monoclonal antibodies anti-DC15-PC5 for identification of neutrophils and anti-CD59-FITC and anti-CD55-PE for the GPI-linked antigens.*

Results. *Patients with haemolytic PNH had >50% CD59/CD55 negative granulocytes. The proportion of the PNH granulocytes was higher in the patient with frequent and serious haemolytic attacks. Over the period of three years slow growth of the PNH clone was seen in two cases. Two patients with PNH diagnosed 19 years ago and in remission at the time of flow cytometric analysis was devoid of the PNH clone. Three patients with aplastic anaemia (hypoplastic PNH) had the proportion of CD59/CD55 negative granulocytes <40%. In one of them PNH clone increased.*

velikosti klona omogoča pri nekaterih bolnikih napoved remisije, pri drugih pa napoved prehoda iz hipoplastične v hemolitično obliko PNH.

Uvod

Značilnosti paroksizmalne nočne hemoglobinurije (PNH) so intravaskularna hemoliza, nagnjenost k trombozami in različne stopnje citopenije v krvni sliki. Bolezen je posledica pridobljene napake krvotvornih matičnih celic zaradi somatske mutacije gena PIG-A na kromosomu X. Gen je odgovoren za nastanek ene od štirih podenot encima (fosfatidilinozitol-acetilglukozaminil transferaza), ki je potreben za prvo stopnjo sinteze glikozilfosfatidilinozitola (GPI). S pomočjo GPI so na celično membrano krvnih celic pritrjene različne beljakovine, med drugimi tudi zaviralca aktivacije komplemента - CD55 (zaviralec konvertaze C3 in C5) in CD59 (zaviralec zadnje stopnje aktivacije komplemента) (1). Zaradi pomanjkanja teh beljakovin pride do povečane dovzetnosti eritrocitov za litični učinek komplemента. Od vrste mutacije je odvisno, ali gre za popolno ali delno inaktivacijo beljakovine, ki jo proizvaja PIG-A. Na ta način si razložimo nastanek eritrocitov z večjo (PNH3) ali manjšo (PNH2) dovzetnostjo za litični učinek komplemента. Ker mutacija prizadene krvotvorno matično celico, nastane klon krvnih celic, ki na površini nima ali ima manj beljakovin, odvisnih od GPI. V krvi bolnikov s PNH tako ugotovimo poleg normalnih tudi klon prizadetih celic (eritrocitov, trombocitov, granulocitov, monocitov in limfocitov). Pri nekaterih bolnikih sta prisotna dva klona eritrocitov (PNH2 in PNH3). Pogosto prisotnost večje ali manjše odpovedi kostnega mozga in povezavo PNH z aplastično anemijo si razlagamo s prisotnostjo dodatnega dejavnika, ki deluje bolj zavirajoče na normalne matične celice kot na klon PNH, s tem pa omogoči njegov razrast (2, 3).

Do uvedbe pretočne citometrije se je PNH ugotavljala z dvema preizkusoma. Sukrozno hemolitični preizkus se je uporabljal kot presejalni preizkus, Hamov preizkus pa za potrditev PNH. Zaradi večje občutljivosti in specifičnosti se danes namesto omenjenih preizkusov uporablja pretočna citometrija, s katero ugotavljamo odsotnost beljakovin, odvisnih od GPI na površini celic.

Prikazujemo naše izkušnje s tribarvno pretočno citometrijo pri ugotavljanju celic (klona) PNH pri bolnikih s PNH in pri bolnikih z aplastično anemijo.

Bolniki in metode dela

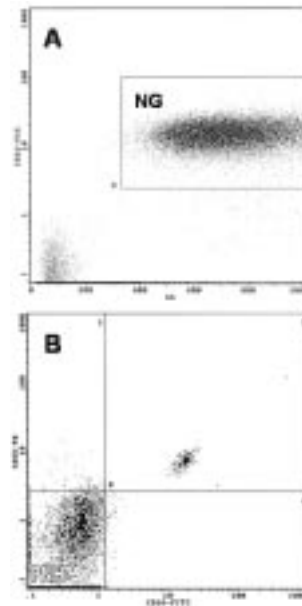
Bolniki

Bolnikom s PNH in aplastično anemijo smo v obdobju treh let nekajkrat določili delež nevtrofilcev z napako PNH. V raziskavo smo vključili devet bolnikov, šest s PNH in tri z aplastično anemijo. Bolnikom s PNH smo bolezen ugotovili v obdobju od 1980. do 1999. leta. Pri dveh bolnikih bolezen v času naše preiskave ni bila več prisotna. Hamov test je bil negativen in ni bilo več znakov za intravaskularno hemolizo (remisija PNH). Pri bolnikih z aplastično anemijo so bolezen ugotovili v obdobju 1994 do 2002. Pri enem bolniku (bolnik 9) je bila aprila 2002 opravljena alogenična transplantacija krvotvornih matičnih celic.

GPI-pomanjkljive nevtrofilce smo ugotavljali s tribarvno pretočno citometrijo. Nevtrofilce smo identificirali kot celice, ki so CD15 pozitivne (od GPI neodvisna beljakovina na zrelih nevtrofilcih) in pri katerih je prisotno močno bočno sipanje

Conclusions. Three colour flow cytometry of granulocytes using combination of anti-CD15/55/59 provides the accurate technique for detection and quantification of the PNH clone. Monitoring the PNH clone size has clinical and prognostic value. The size of the PNH clone is an important determinant for thrombotic risk. Serial studies allow prediction of remission in some cases or progress from hypoplastic to hemolytic PNH in others.

svetlobe (light side scatter), kar je znak granulocitov. Na tako izbrani populaciji celic smo izmerili delež tistih, ki niso imele na površini CD55 in CD59 (beljakovini, odvisni od GPI) (Sl. 1).



Sl. 1. Način ugotavljanja nevtrofilcev (A) in ocena na GPI vezanih antigenov (B).

Figure 1. Gating strategy (A) and analysis of GPI-linked antigen expression on neutrophils (B).

Za raziskavo smo uporabili vensko kri bolnika, ki ji je dodan antikoagulans (heparin ali EDTA). Kri zdravega dajalca smo uporabili za pozitivno kontrolo. Za pozitivno notranjo kontrolo lahko v večini primerov koristimo preostalo populacijo normalnih nevtrofilcev. Predstavlja referenčno populacijo, s katero primerjamo klon PNH in reaktivnost monoklonskih protiteles. V dve označeni epruveti smo odpipetirali 100 µl krvi, dodali 2 ml raztopine amonijevega klorida in pustili stati pripravek 10 minut na sobni temperaturi, da je prišlo do lize eritrocitov. Po centrifugiranju in odstranitvi supernatanta smo levkocite dvakrat sprali s puferirano fiziološko raztopino. Nato smo v prvo epruveto dodali 20 µl izotipskih kontrol, v drugo pa 20 µl monoklonskih protiteles. Uporabili smo monoklonska protitelesa anti-CD15-PC5, CD55-PE in CD59-FITC (Immunotech, France), ki so bila označena s tremi različnimi fluorescenčnimi barvili: CD15 s fikoeritrin-cianinom 5,1 (PC5), CD55 s fikoeritrinom (PE) in CD59 s fluorescein-izotiocianatom (FITC). Po končani 15-minutni inkubaciji s protitelesi smo odčitali vrednosti na pretočnem citometru.

Rezultati

Bolniki s PNH so imeli več kot 50% nevtrofilcev z napako PNH (CD 55/59 negativni). Bolnik z največjim klonom (bolnik 1) je

Razpr. 1. Laboratorijski izsledki pri bolnikih s PNH in AA.

Table 1. Laboratory data in patients with PNH and AA.

Bolnik Patient	Dg	Mesec/leto Month/year	Hamov test* Ham's test*	NG 10%/L	NG CD55/59-	Hb g/L	Ret 10%/L	Tr 10%/L
1	PNH	11.2000		5,7	72%	145		190
		02.2001	73%	8,7	70%	131	47	154
		04.2001		5,9	82%	94		109
		08.2001		2,4	98%	85		107
		10.2001		0,7	78%	75		67
		10.2002		1,7	99%	92	146	122
		03.2003		2,3	98%	115		188
		11.2003		2,3	99%	128		162
2	PNH	11.2000		2,6	46%	92		213
		05.2001	24%	2,7	55%	62	125	166
		02.2004		5,0	64%	75	209	199
3	PNH	11.2000	37%	1,9	62%			
		05.2001	54%	1,8	74%	84	113	291
		02.2004		1,7	63%	82	163	280
4	PNH	11.2000	10%	6,0	62%	98		404
		09.2002		3,1	89%	109	166	355
		02.2004		3,8	73%	96	231	426
5	PNH remisija	11.2000	0%	1,4	0%			
		03.2001		1,0	0%	93	52	28
		09.2001		0,7	0%	77	11	25
6	PNH remisija	02.2001	0%	6,1	0%	132		430
		09.2001		7,5	3%	126	55	415
7	AA	05.2001		0,6	37%	70		39
		02.2002		0,4	39%	68		47
		02.2004		2,4	70%	86	61	84
8	AA	03.2002		0,5	21%	70		20
		02.2004		1,5	17%	136	59	131
9	AA po TKMC	03.2002		0,2	7%	68		18
		04.2002		2,6	10%	119		88
		02.2004		1,2	0%	135	33	237

Dg - diagnoza, PNH - paroksizmalna nočna hemoglobinurija; AA - aplastična anemija, NG - nevtrofilci, NG CD55/59 - CD55/59 negativni nevtrofilci, Hb - hemoglobin, Ret - retikulociti, Tr - trombociti, TKMC - transplantacija krvotvornih matičnih celic, * - hemoliza

Dg - diagnosis, PNH - paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, AA - aplastic anaemia, NG - neutrophils, NG CD55/59 - CD55/59 negative neutrophils, Hb - haemoglobin, Ret - reticulocytes, Tr - platelets, TKMC - transplantation of haematopoietic stem cells, * - haemolysis

imel najbolj aktivno bolezen s številnimi hudimi napadi hemolize in pogostimi hospitalizacijami. Pri dveh bolnikih v remisiji nismo ugotovili napake PNH ali pa je bil delež teh celic minimalen (3%). Pri bolniku 1 in 2 smo v triletnem obdobju opazovali postopno večanje klona PNH.

Do povečanje klona PNH je prišlo tudi pri bolniku 7 z aplastično anemijo (hipoplastična PNH). Bolnika 9 smo zdravili z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic. Po presaditvi nismo več ugotovili celic z napako PNH.

Razpravljanje

Občutljivost eritrocitov na litični učinek komplementa se je vrsto let uporabljala kot posredni kazalec za napako PNH. Pretočna citometrija omogoča, z uporabo monoklonskih protiteles proti antigenom, ki so z GPI pritrjeni na celično membrano, bolj specifično ugotavljanje celic z napako PNH. Najpogosteje določamo antigena CD55 in CD59, ker sta normalno prisotna na levkocitih, eritrocitih in trombocitih v sorazmerno veliki količini. Za potrditev PNH je potrebno ugotoviti sočasno pomanjkanje vsaj dveh antigenov (npr. CD55 in CD59). Na ta način se izognemo laboratorijskim napakam in možnosti zamenjave za prirojeno pomanjkanje samo enega antigena. Običajno se določa napaka PNH na eritrocitih ali granulocitih. Priporočajo, da se za ugotavljanje PNH uporabijo obe vrsti celic (4). V redkih primerih je v krvi prisoten klon PNH samo pri granulocitih. Po hudi hemolizi in številnih transfuzijah se lahko število PNH eritrocitov zmanjša pod mejo zaznavanja. Na drugi strani pa je lahko pri bolnikih s hudo aplazijo število granulo-

citov premajhno za oceno. Preiskava eritrocitov omogoča razlikovanje med celicami z napako PNH3 in PNH2 (5, 6). To razlikovanje je pri granulocitih težje. Določanje deleža granulocitov z napako PNH je primerna preiskava za oceno velikosti klona (7). Za razliko od eritrocitov napaka PNH ne skrajša življenjske dobe granulocitov. Identifikacija granulocitov samo na osnovi njihovih fizikalnih značilnosti (sprednje in bočno sipanje svetlobe) v določenih primerih ni točna. Pri mielodisplastičnih sindromih je v krvi znaten delež agranularnih nevtrofilcev. Temu se izognemo z uporabo tribarvne pretočne citometrije, kjer ugotavljamo nevtrofilce s pomočjo bočnega sipanja svetlobe in monoklonskih protiteles proti antigenu CD15. Preostala dva fluorescenčna kanala uporabimo za oceno dveh na GPI vezanih antigenov (CD55 in CD59). Pomemben je tudi način priprave vzorca. Metoda, pri kateri najprej liziramo eritrocite in šele nato z monoklonskimi protitelesi označimo celice, je boljša od metode, kjer naprej označimo celice in nato liziramo eritrocite, ker omogoča uporabo optimalnega titra protiteles (8). Pri drugi metodi je to oteženo, ker se protitelesa vežejo tudi na eritrocite in trombocite. Preiskavo granulocitov je potrebno napraviti znotraj prvih nekaj ur. Ko se granulociti in vitro starajo, naraščata nespecifična vezava protiteles in avtofluorescenca. Nedavno so razvili nov način določanja celic PNH z neaktivnim toksinom aerolizinom, ki je označen s fluorescentnim barvilom. Ta označevalec je boljši

kot katero koli protitelo proti beljakovinom, ki so vezane na GPI. Veže se namreč neposredno na sidro GPI (9, 10).

Možnost, da s pretočno citometrijo odkrijemo majhne klone pri bolnikih z aplastično anemijo, kjer je Hamov preizkus negativen, je omogočila, da razlikujemo dve vrsti PNH: hemolitično in hipoplastično PNH. Med zadnjo sodi aplastična anemija s klonom PNH. Ocenjujejo, da je ob ugotovitvi aplastične anemije prisoten klon PNH pri tretjini bolnikov (11). Značilnosti hemolitične PNH sta intravaskularna hemolitična anemija in nagnjenost k venskim trombozom. Slednje so tudi glavni vzrok povečane umrljivosti. Pri hipoplastični PNH ni očitne hemolize, pač pa je v ospredju anemija, trombocitopenija in levkopenija. Bolniki s hemolitično PNH imajo več kot 10% eritrocitov z napako PNH3. Pri hipoplastični PNH je navadno prisoten samo klon PNH2. Glavna razlika med hemolitično in hipoplastično PNH je v velikosti klona PNH. Delež nevtrofilcev z napako PNH pri hemolitični obliki je več kot 50%. Pri hipoplastični PNH je klon navadno manjši od 20% (12). Velikost klona PNH je premosorazmerna s stopnjo anemije (7). Tudi pri naših bolnikih smo opazovali omenjene značilnosti. Pri dveh bolnikih s spontano remisijo smo le-to potrdili z odsotnostjo klona PNH ali z deležem celic PNH pod 5%. Remisija bolezni pri PNH ni redka. Do nje pride v približno 15% (13). S spremljanjem velikosti klona lahko ugotovimo, kateri bolnik je na poti v remisijo. Ocena velikosti klona je pomembna tudi za oceno tveganja za trombotične zaplete. Ugotovili so, da je 10-letno tveganje za trombozo pri bolnikih z velikim klonom (> 50%) 44%, pri bolnikih z majhnim klonom pa 5,8% (14). Trombotične zaplete lahko preprečimo s preventivnim dajanjem antikoagulacijskih zdravil (marivarin).

Zaključki

Ugotavljanje deleža nevtrofilcev z napako PNH nima le diagnostičnega pomena. To potrjujejo naše izkušnje in podatki iz literature. Omogoča dokaj dobro oceno velikosti klona PNH in s tem tudi spremljanje njegove dinamike. Ti podatki so pomembni tudi pri odločanju za zdravljenje. Pri bolnikih z velikim klonom se bomo zaradi povečanega tveganja za trombozo odločili za preventivno zdravljenje z marivarinom. Če ugotovimo postopno zmanjševanje velikosti klona, je verjetnost, da bo prišlo do remisije, znatna. V tem primeru bomo odsvetovali zdravljenje s presaditvijo krvotvornih matičnih celic.

Literatura

1. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE eds. Hematology: basic principles and practice. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 331–42.
2. Luzzato L. Pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematologica* 2000; 84: 203–9.
3. Schrezenmeier H, Hildebrand A, Rojewski M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: replacement of haemopoietic tissue. *Acta Haematol* 2000; 103: 41–8.
4. Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42: 223–33.
5. Borowitz MJ. Flow cytometry testing in PNH. How much is enough? *Cytometry* 2000; 42: 221–2.
6. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332–40.
7. Piedras J, Lopez-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry* 2000; 42: 234–8.
8. Hernandez-Campo PM, Martin-Ayuso M, Almeida J, Lopez A, Orfao A. Comparative analysis of different flow cytometry-based immunophenotypic methods for the analysis of CD59 and CD55 expression on major peripheral blood cell subsets. *Cytometry* 2002; 50: 191–201.
9. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 459–66.
10. Krauss JS. Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 401–6.
11. Maciejewski JP, Rivera C, Kook H, Dunn D, Young NS. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* 2001; 115: 1015–22.
12. Hillmen P, Richards SJ. Implication of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2000; 108: 470–9.
13. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253–8.
14. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003; 102: 3587–91.