

CHOICE OF DONOR—RECIPIENT SIBLING-PAIRS FOR ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

BUC M, KUSIKOVA M, FAZEKASOVA H, KRALOVICOVA J, HOLOMANOVA D, MISTRÍK M, SAKALOVA A

VÝBER PÁROV DARCA—PRÍJEMCA V RODINÁCH PRE ALOGÉNNU TRANSPLANTÁCIU KOSTNEJ DRENE

In the years 1985—1999 452 were families investigated with the aim to find up an HLA-identical sibling for a patient suffering from a disease, the treatment of which requires bone marrow transplantation. Total number of investigated siblings (including patients) was 1334. HLA typing was done by serological methods, mixed lymphocyte culture test (MLC), and in the last three years also by DNA-typing (PCR-SSP). 188 HLA identical donor-recipient sib-pairs were found. At the same time the number shows that a potential donor could be found in 41.5 % of investigated families.

Key words: HLA-complex, bone marrow transplantation, tissue typing, HLA-identical siblings.

V rokoch 1985—1999 sme vyšetrili 452 rodín s cieľom nájsť HLA-identického súrodenca, ktorý by bol potencionálnym darcom kostnej drene pre svojho súrodenca s chorobou, ktorej liečba si vyžaduje transplantáciu kostnej drene. Celkovo sme vyšetrili 1334 súrodencov. HLA-typizácia sa robila sérometódami, testom zmiešaných lymfocytových kultúr (MLC) a v posledných troch rokoch aj metódami molekulárnej genetiky (PCR-SSP). Celkovo sme našli 188 HLA-identických súrodencových dvojíc. Toto číslo súčasne ukazuje, že potencionálny darca kostnej drene sa vyskytol v 41,5 % vyšetrených rodín.

Kľúčové slová: HLA-komplex, transplantácia kostnej drene, HLA-typizácia, HLA-identickí súrodenci.

Transplantácie tkanív a orgánov sa dnes stali relatívne bežnou a rutinnou metódou liečby početných ochorení. Svečí o tom viac ako 20 000 nových transplantácií, ktoré pribúdajú ročne a ktorých úspešnosť sa stále zvyšuje. Vďačíme za to najmä dvom faktorom, ktoré rozhodným spôsobom prispeli a prispievajú k úspechom klinickej transplantácie. Ide o pokroky v oblasti imunogenetiky HLA-komplexu (obr. 1) a objavenie účinných imunosupresív.

Na Slovensku sa začalo najprv s transplantáciami obličiek (Zvara a Rezníček, 1973; Laca, 1998), neskôr s transplantáciami kostnej drene (TKD) (Mistrík a spol., 1991), dnes sa už robí aj transplantácia srdca (Fabián, 1999), začalo s transplantáciou pečene a pripravuje sa transplantácia pľúc.

Výber darcu pre TKD sa od výberu pre transplantácie obličiek, resp. iných orgánov odlišuje v tom, že je snaha dodržať identitu vo všetkých HLA-antigénoch prvej aj druhej triedy. V opačnom prípade sa totiž vyvíja choroba z reakcie transplantátu proti hostiteľovi (GvHD), ktorá sa môže končiť aj smrťou pacienta. Najideálnejšie sa hľadá darca v rámci rodiny (obr. 2), pretože tu je 25 % pravdepodobnosť nájdania HLA-identického darcu. V našom článku chceme uviesť výsledky výberu párov darca-príjemca

pre transplantácie kostnej drene v rodinách, ktoré pre potreby celého Slovenska robíme od roku 1985.

Materiál a metódy

Na Klinikum hematológie a transfúziológie Fakultnej nemocnice v Bratislave boli prijatí chorí s rôznymi formami leukémie, resp. s aplastickou anémiou a ako forma liečby prichádzala do úvahy TKD. Od r. 1985 do r. 1999 išlo o 452 pacientov. Za účelom nájdania HLA-identického súrodenca sme vyšetrili rodiny pacientov, t.j. rodičov (494), súrodencov pacientov (882), prípadne iných príbuzných (188).

HLA-typizácia v rokoch 1985—1996 sa zakladala na sérologickú identifikáciu HLA-antigénov prvej triedy a jednocestnom, resp. dvojcestnom MLC-teste. Od roku 1997 k týmto dvom prístupom pribudla DNA-typizácia HLA-alel druhej triedy, konkrétne alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1.

HLA-antigény prvej triedy sme určovali mikrolymfocytotoxickým testom. Jeho princíp je v tom, že protilátky v typizačných sérach reagujú s HLA-antigénmi, ktoré sa nachádzajú v membráne lymfocytov vyšetrovanej osoby. Ak táto osoba daný antigén má, v reakcii prítomný komplement terčové bunky usmrtí a reakcia je pozitívna. V opačnom prípade sa protilátky na lymfocyty nenadväzujú, komplement sa takto neaktivuje a bunky zostávajú živé; reakcia je negatívna. Podrobnejší metodický postup možno nájsť v našej predchádzajúcej práci (Buc a spol., 1975; Nyulassy a spol., 1977).

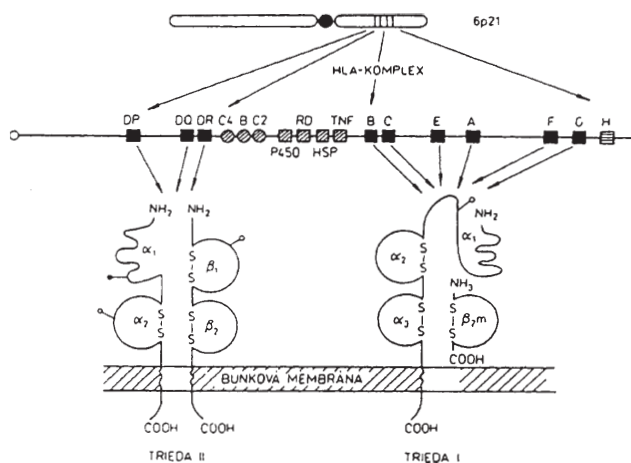


Fig. 1. Gene map of the HLA complex. The HLA gene region is localised on the short arm of the chromosome 6. Many loci are present in the region. Genes of loci closer to the centromere, — DP, DQ, DR — code for HLA antigens belonging to class II, those present in a telomeric part of the region — A, B, C, E, F, G — code for a similar, however independent group of HLA antigens, designated as class I. Genes between the loci HLA-B and HLA-DR belong to class III. C2, C4, B — genes for particular factors of the complement system, HSP — heat shock protein, RD — protein RD (repeated dimers), TNF — tumour necrosis factor.

Obr. 1. Génová mapa HLA-komplexu. HLA-genetická oblasť sa nachádza na krátkom ramene 6. chromozómu. Skladá sa z početných lokusov. Gény lokusov umiestnených centromericky — DP, DQ, DR — kódujú HLA-antigény, ktoré zaradujeme do druhej triedy. Gény telomericých lokusov — A, B, C, E, F, G — determinujú opäť určitú samostatnú skupinu HLA antigénov označovanú spoločným názvom ako prvá trieda. Gény nachádzajúce sa medzi HLA-DR a HLA-B patria k tretej triede. C2, C4, B — gény pre príslušné zložky komplementového systému, HSP — proteín teplotného šoku, RD — proteín RD, TNF — faktor nekrotizujúci nádory.

MLC-test je priamy biologický test, pri ktorom sa lymfocyty darcu a príjemcu navzájom kultivujú v kultivačnom médiu. V prípade, že testovaní jedinci sú biologicky rozdielni, líšia sa v HLA-antigénoch druhej triedy, ich lymfocyty sa navzájom stimulujú, dostávajú sa do mitotickej aktivity, ktorú meriame na základe inkorporácie rádioaktívnych prekursorov do DNA. Čím vyššia je inkorporácia, tým je medzi testovanými jedincami väčší rozdiel. Podrobnejší metodický postup sme uviedli predtým (Buc a spol., 1977).

DNA-typizácia vychádza z polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Robí sa tak, že na vyzolovanej dvojvláknovej molekule DNA sa pomocou komplementárnych oligonukleotidov (sondy = primery) označí úsek obsahujúci požadovaný gén, ktorý sa potom amplifikuje opakovanými cyklami denaturácie, ochladenia a pripojenia primerov a ich dosyntetizovania pomocou termostabilnej DNA-polymerázy. Presný metodický postup je v našej nedávnej práci (Fazekašová a spol., 1998).

Výsledky

Celkovo sme vyšetrili 452 rodín, v ktorých bolo celkovo 1334 súrodencov, vrátane pacientov. Išlo teda o rodiny s priemerným počtom detí 2,95, aj keď počet detí v rodine sa vyskytoval od jed-

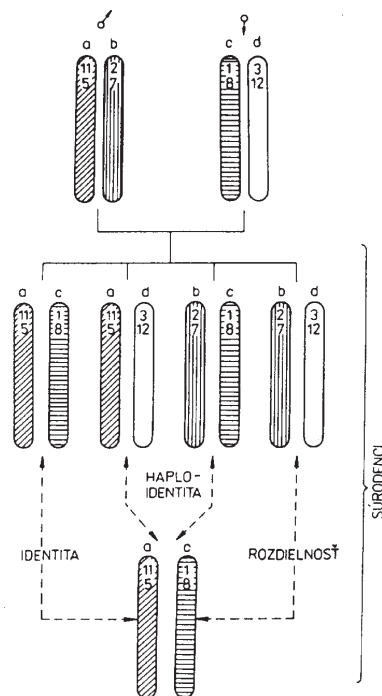


Fig. 2. A scheme of inheritance of HLA-haplotypes. A father has haplotypes a and b, a mother haplotypes c and d. The segregation of haplotypes obeys the Mendelian rules of codominant inheritance. Theoretically, four possible combinations of haplotypes can occur in a family with 4 children: ac, ad, bc, bd. Each next child of the parents has to have only such a combination of haplotypes, that already occurred previously, e.g. ac. Siblings are either HLA-identical (25%), i.e. they share both haplotypes, HLA-haploidentical (50%), i.e. they share only one haplotype and differ in another one, or HLA-different (25%), i.e. they share no haplotype. The relationship of parents to their children is always haploidentical.

Obr. 2. Schéma dedičnosti HLA-haplotypov. Otec má haplotypy a, b, matka haplotypy c, d. Dedičnosť haplotypov sa riadi Mendelovými zákonmi o kodominantnej dedičnosti. V rodine so 4 deťmi, súrodenci môžu mať teoreticky 4 možné kombinácie haplotypov: ac, ad, bc, bd. Každé ďalšie dieťa týchto rodičov môže mať už len predtým sa vyskytujúcu kombináciu haplotypov, napr. ac. Súrodenci navzájom sú buď HLA-identickí (25%), t.j. zhodujú sa v oboch haplotypoch, alebo HLA-haploidentickí (50%), t.j. majú jeden spoločný haplotyp a v druhom sa líšia, alebo sú HLA-rozdielni (25%), t.j. nemajú spoločný ani jeden haplotyp.

ného až po 10. Najčastejšie išlo o chorých s chronickou myeloidnou leukémiou (CML) (tab. 1). HLA-identického súrodencia, t.j. brata alebo sestru, ktorí sa s pacientom zhodovali v HLA-antigénoch prvej triedy, HLA-alelách druhej triedy a ich lymfocyty sa v MLC-testoch sa navzájom nestimulovali, sme našli pre 188 pacientov. Toto číslo znamená, že transplantáciu kostnej drene sme mohli odporučiť v 41,5 % rodín. Celkovo HLA-identickí súrodenci sa vyskytli v 28,19%, čo je mierne nad štatisticky očakávaným číslom 25 %.

Komplexným prístupom k vyhľadávaniu HLA-identických súrodeneckých dvojíc bolo možné sledovať aj rekombinácie medzi lokusmi HLA-B a HLA-DR a zisťovať homozygótnosť pre HLA-DR/Dw antigény. Celkovo sme pozorovali tri rekombinácie a zistili sme 7 homozygótnych osôb.

Diskusia

Transplantácia kostnej drene je dnes už metódou voľby pre liečbu celého radu chorôb, najmä pre liečbu rôznych foriem leukémie (z nich predovšetkým CML), aplastickej anémie, choroby z ožiarenia a podobne (Buc, 1997). Jedným zo základných predpokladov úspešnej transplantácie je zabezpečiť, aby sa darca aj príjemca zhodovali v antigénoch hlavného histokompatibilného komplexu, ktorý sa u človeka označuje skratkou HLA. Na určovanie HLA-identity máme k dispozícii sérologické a celulárne techniky, ku ktorým v nedávnom čase pribudli presné a rýchle metódy DNA-typizácie. Je potešiteľné, že aj na Slovensku sme zachytili celosvetový trend a transplantácie kostnej drene sa robia aj u nás. V predkladanom článku uvádzame naše výsledky vyhadávania párov darca-príjemca v rodinách, ktoré sme robili v rokoch 1985 až 1999. HLA-identického, a teda biologicky ideálneho darcu sme našli pre 188 pacientov, čo predstavuje 41,59 % z celkového počtu 452 chorých. Ide o skúsenosť, ktorú uvádzajú aj iné pracoviská (Bach a Auchingloss, 1995; Bogovich a Erlich, 1995).

Na zisťovanie HLA-identity sme použili dva prístupy. V rokoch 1985—1996 sme na výber párov „darca—príjemca“ v rodinách využívali sérotypizáciu HLA-A, -B a -C antigénov a v prípade nájdenia identického páru sme si ich zhodu v HLA-antigénoch druhej triedy overovali testami MLC. Okrem troch prípadov, keď sme zistili rekombináciu medzi lokusmi HLA-B a HLA-DR, MLC test potvrdil očakávanú zhodu danej dvojice. MLC-testy súčasne umožnili odhaľovať osoby, ktoré boli homozygótne pre HLA-DR/Dw antigény. Takéto osoby boli potom zdrojom pre homozygótne typizačné bunky, ktoré sa používajú pre určovanie HLA-Dw antigénov. Od r. 1996, keď sme zaviedli do rutínnej praxe DNA-typizáciu (Fazekašová a spol., 1998), využívame na výber transplantáčnej dvojice všetky tri techniky. Skúsenosti totiž ukazujú, že aj keď na výber dvojice „darca—príjemca“ stačí použiť jednu z dvoch kombinácií, t.j. HLA-sérologiu a MLC-testy alebo HLA-sérologiu a DNA-typizáciu, predsa problémy, s ktorými sa stretávame pri vyhodnocovaní procese sa lepšie prekonávajú pri súčasnom vyhodnocovaní výsledkov z troch rozličných metodických prístupov. Ide síce o časovo aj ekonomicky náročnejší prístup, ale vzhľadom na závažnosť prípadnej GvH-reakcie v prípade nesprávne určenej zhody, je to postup oprávnený.

Literatúra

Bach F.H., Auchingloss H. (Eds.): Transplantation immunology. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons 1995, 409 s.

Bogovich A.B., Erlich H.A.: HLA typing for bone marrow transplantation. *J. Amer. Med. Ass.*, 273, 1995, s. 586—591.

Buc M., Nyulassy Š., Hegyi V., Hirschová V., Štefanovič J.: Zmiešané lymfocytárne kultúry (MLC test) u HLA-identických príbuzných a nepríbuzných osôb. *Bratisl. lek. Listy*, 68, 1977, 148—156.

**Tab. 1. The diagnosis of investigated patients.
Tab. 1. Diagnóza vyšetrovaných pacientov.**

Diagnosis Diagnóza	Number Počet
CML – chronic myeloid leukemia CML – chronická myeloidná leukémia	133
ALL – acute lymphatic leukemia ALL – akútna lymfatická leukémia	101
AML – acute myeloid leukemia AML – akútna myeloidná leukémia	88
MDS – myelodysplastic syndroma MDS – myelodysplastický syndróm	30
NHL – Non-Hodgkin lymphoma NHL – non-Hodgkinov lymfóm	20
SAA – severe aplastic anemia SAA – ťažká aplastická anémia	53
Others Iné	27
Total Spolu	452

Buc M., Nyulassy Š., Štefanovič J.: Zisťovanie, biologický a medicínsky význam histokompatibilných (transplantačných) antigénov. *Folia Fac. Med. Univ. Comenianae*, 13, 1975, s. 75—124.

Buc M.: Klinická imunológia. Bratislava, Veda 1997, 364 s.

Fabián J.: Program transplantácie srdca na Slovensku. 2. slovenský transplantáčny kongres s medzinárodnou účasťou. Bratislava, 22.—26. október 1999.

Fazekašová H., Shawkatová I., Buc M., Ferenčík S.: Frekvencia alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 v slovenskej populácii. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 601—604.

Laca L. (Ed.): Orgánové transplantácie. Transplantácia obličiek. Banská Bystrica, DALLI 1998, 160 s.

Mistrík M.: Naše skúsenosti s transplantáciou kostnej drene. *Klin. imunol. alergol.*, 1, 1991, s. 5—6.

Nyulassy Š., Hirschová V., Buc M., Silvánová E., Štefanovič J.: Sledovanie HLA systému v slovenskej populácii. Frekvencia antigénov A, B a C lokusov. *Bratisl. lek. Listy*, 68, 1977, s. 436—444.

Zvara V., Řezníček J.: Možnosti aktívnej liečby terminálneho štádia chronickej nedostatočnosti obličiek chronickou hemodialýzou a transplantáciou obličiek. *Lek. Obzor*, 22, 1973, s. 489—495.

Received November 12, 1999.

Accepted January 11, 2000.