

MICHAŁ WITT

Hematologia molekularna – nowoczesna metodologia w służbie pacjenta i nauki

W ciągu ostatnich lat obserwuje się gwałtowny rozwój metod molekularnych, pozwalających w sposób precyzyjny i z wysoką czułością wspierać dotychczasowe tradycyjne metody badawcze i diagnostyczne stosowane w hematologii, np. przez identyfikację genów fuzyjnych powstających w wyniku translokacji, analizę choroby resztkowej oraz poprzyszczepowego chimeryzmu komórkowego. Stanowią one metodologiczną podstawę nowego działu badań naukowych w hematologii, jakim staje się hematologia molekularna. Zastosowanie metod biologii molekularnej w istotny sposób unowocześnia podstawowe badania naukowe w tym dziale medycyny, pozwalając odpowiedzieć na fundamentalne pytania dotyczące biologii komórek hematopoetycznych, przebiegu procesu leukemogenezy, odpowiedzi na terapię itp. Jednocześnie metody te rewolucjonizują diagnostykę hematologiczną, szybko stając się niezbędnym elementem nowoczesnych programów diagnostyczno-terapeutycznych. Ich użycie staje się głównym zadaniem lawinowo powstających hematologicznych laboratoriów diagnostyki molekularnej – również w Polsce laboratoria takie powstają ostatnio w dużej liczbie. Spowodowane jest to niezwykle znaczeniem, jakie w nowoczesnej klinice hematologicznej przypisuje się danym molekularnym, które w wielu wypadkach w sposób jednoznaczny doprecyzowują stawiane rozpoznania lub uściślają prognozę kliniczną. W chwili obecnej nie można sobie wyobrazić skutecznego, zgodnego z nowoczesnymi kryteriami, prowadzenia chorego po allogenicznym przeszczepieniu komórek hematopoetycznych czy poddawanego innym nowoczesnym formom terapii, bez ciągłego monitorowania molekularnych wykładników choroby. Jednocześnie, ze względu na olbrzymie zapotrzebowanie ze strony ośrodków klinicznych z jednej strony oraz wysokie koszty takich badań z drugiej, wypracowanie ogólnokrajowego, spójnego systemu organizacyjno-technologicznego takich badań staje się w kraju wielkości Polski palącym wymogiem chwili.

Dzięki wspomnianemu rozwojowi metod molekularnych stosowanych w hematologii, możliwa stała się stosunkowo szybka i wiarygodna identyfikacja bardzo niewielkiej

liczby komórek nowotworowych, znanych pod nazwą choroby resztkowej (*minimal residual disease*, MRD). Jak wskazują dotychczasowe badania, w niektórych z chorób hematologicznych ocena poziomu MRD umożliwia precyzyjne określenie prognozy klinicznej, umożliwia wczesną ocenę odpowiedzi na leczenie, pozwala na szybką interwencję terapeutyczną itp.

W przypadku wielu hematologicznych chorób rozrostowych (białaczki ostre i przewlekłe, zespoły mielodysplastyczne, niezziarnicze chłoniaki złośliwe) istnieją wskazania do przeprowadzenia allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych, która daje szansę trwałego wyleczenia. Niezależnie od rodzaju przeprowadzonej transplantacji allogenicznej, rutynowym postępowaniem zawsze powinno być monitorowanie stanu pacjenta poprzez analizę chimeryzmu komórek hematopoetycznych. Dzięki niemu możliwe jest stwierdzenie zmian w składzie komórkowym krwi obwodowej/szpiku kostnego świadczących o przyjęciu/odrzuconiu przeszczepu oraz, przez analizę kinetyki tych zmian, prognozowanie dalszego przebiegu okresu potransplantacyjnego. Zmiany na poziomie molekularnym z reguły znacznie wyprzedzają w czasie wystąpienie zaburzeń w rutynowych badaniach hematologicznych i objawów klinicznych choroby, stąd ich szczególna wartość prognostyczna. Badanie chimeryzmu pozwala wyselekcjonować chorych z wysokim ryzykiem wznowy, co może przekładać się na konkretne decyzje terapeutyczne, np. zastosowanie infuzji limfocytów dawcy (*donor lymphocyte infusion*, DLI).

Współczesne protokoły lecznicze prowadzą do całkowitej remisji u znacznego odsetka chorych na ostre białaczki, jednak po pewnym czasie u wielu z nich dochodzi do nawrotu choroby zasadniczej. Oznacza to, że chociaż u chorego stwierdzono całkowitą remisję w oparciu o kryteria kliniczne i morfologiczne, zastosowane leczenie nie doprowadziło do efektu najbardziej pożądanego: całkowitej eliminacji komórek nowotworowych z układu hematopoetycznego. Metody morfologiczne pozwalają na wykrycie komórek nowotworowych, gdy stanowią one generalnie powyżej 5% badanej populacji komórek: ocena na tym poziomie czułości daje ograniczony wgląd w efektywność leczenia, ponieważ jedynie chorzy o niekorzystnej prognozie (nie uzyskujący remisji) mogą zostać zidentyfikowani przy użyciu badań cytomorfologicznych. U chorych w remisji metody morfologiczne nie pozwalają na zróżnicowanie między białaczkami o wysokim i niskim ryzyku wznowy. Stąd właśnie bardzo czułe molekularne metody badania MRD są elementem umożliwiającym wykrywanie komórek nowotworowych tam, gdzie metody morfologiczne okazują się zbyt mało czułe. Stosowane obecnie metody molekularne charakteryzują się czułością przynajmniej 10^{-3} (identyfikacja jednej komórki nowotworowej na 1000 komórek badanych; najnowsze z tych metod charakteryzują się czułością 10^{-4} - 10^{-6}), niskim ryzykiem wyników fałszywie dodatnich, stabilnością markerów nowotworowych (niskie ryzyko wyników fałszywie ujemnych), możliwością łatwej standaryzacji metod, powtarzalnością uzyskiwanych wyników oraz możliwością analizy ilościowej.

Pozyskiwanie i bankowanie materiału biologicznego stanowi integralną część badań medycznych. Lawinowy postęp w rozwoju technik molekularnych i informatycznych otwiera, nieosiągalne dotąd, możliwości prowadzenia badań naukowych na skalę populacyjną. W wielu krajach obserwuje się rosnące zainteresowanie tworzeniem banków materiału biologicznego na potrzeby szeroko zakrojonych projektów badawczych, realizowanych obecnie, jak i w przyszłości. Projekty te dotyczą najczęściej zależności między czynnikami środowiskowymi i genetycznymi a występowaniem poważnych schorzeń, jak nowotwory, cukrzyca czy choroby układu krążenia. Niezbędnym warunkiem realizacji takich projektów jest badanie materiału biologicznego, pozyskanego od licznych grup dawców, w połączeniu z analizą szczegółowych danych, dotyczących m.in. stanu zdrowia, wyników badań klinicznych oraz trybu i warunków życia.

Wiele instytucji, jak uniwersytety, szpitale, instytuty naukowe, posiadają zbiory materiału biologicznego, kolekcjonowanego na potrzeby prowadzonych badań, dotyczących wybranych modelowych schorzeń. Kolekcje te stanowią banki materiału biologicznego, w rozumieniu powszechnie przyjętej definicji, pod warunkiem że jego gromadzeniu towarzyszy dokumentacja i archiwizacja odpowiednich danych. Ścisłe powiązanie materiału biologicznego z charakteryzującymi go danymi stanowi podstawowy warunek przydatności takiego banku do badań naukowych. Dlatego integralnym elementem procesu biobankowania jest konstrukcja informatycznych baz danych, służących nie tylko archiwizacji, ale także wielostronnej analizie, dotyczącej zebranego materiału i jego dawców.

Drugim kluczowym elementem biobankowania jest pozyskanie zgody dawcy na pobranie i przechowywanie materiału oraz danych, a także na ich wykorzystanie w badaniach naukowych, przy jednoczesnym przestrzeganiu zasad ochrony danych osobowych. W przypadku osób nieletnich, bądź niezdolnych do wyrażenia tzw. świadomej zgody (*z ang. informed consent*), prawo to przysługuje, odpowiednio, rodzicom lub opiekunom prawnym. Planując utworzenie banku materiału biologicznego, należy tak skonstruować formularz świadomej zgody, aby umożliwił on wykorzystanie zgromadzonego materiału nie tylko na potrzeby aktualnie wdrażanego projektu badawczego, ale także z myślą o przyszłych przedsięwzięciach naukowych, które na jego bazie mogą być inicjowane i realizowane. Formularz powinien przewidywać możliwość wykorzystania próbek i danych w innych badaniach, tematycznie wykraczających poza ramy danego projektu, po zaaprobowaniu przez właściwą komisję etyczną. Z jednej strony należy zwrócić uwagę, by wyrażona zgoda nie była ograniczona limitem czasu i przewidywała możliwość użycia materiału w bliżej nieokreślonej przyszłości, bez konieczności powtórnego docierania do dawców w celu odnowienia zgody, z drugiej zaś zapewniała dawcy prawo do wycofania wcześniej udzielonej zgody, a w konsekwencji zniszczenie zdeponowanego materiału. Ponieważ wartość naukowa banku materiału biologicznego rośnie w miarę powiększania się kolekcji, należy mieć świadomość, iż w świetle obowiązujących standar-

dów europejskich i światowych próbki i dane bez odpowiednio sformułowanej zgody dawców na ich wykorzystanie stają się praktycznie bezużyteczne.

Generalną cechą charakterystyczną hematologii molekularnej w ogóle jest ścisłe współistnienie nurtu poznawczego oraz nurtu aplikacyjno-diagnostycznego, które oparte są z reguły na tej samej platformie metodyczno-aparaturowej. Obydwa te nurty w sposób oczywisty pozostają w ścisłej zależności od kliniki i jej wymogów. W najważniejszych europejskich ośrodkach badawczych zajmujących się hematologią molekularną badania takie były finansowane w fazie wstępnej z budżetów badawczych, co umożliwiło wypracowanie standardów diagnostycznych w ścisłym oparciu o prowadzone tamże badania naukowe. Podobny model, opierający się na konsorcjum realizatorów, zaproponowany został również w Polsce poprzez skonstruowanie projektu zamawianego Komitetu Badań Naukowych (przejętego później formalnie przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju) pt. „Zaawansowane metody molekularne w hematologii. Opracowanie i wdrożenie standardów badań choroby resztkowej, chimeryzmu poprzyszczepowego i translokacji markerowych”.

We wspomnianym projekcie połączono elementy hematologii pediatrycznej oraz hematologii dorosłych, głównie w zakresie badań podstawowych, z elementami aplikacji praktycznych. Idea projektu zrodziła się z inicjatywy kilku ważnych ośrodków hematologii molekularnej (Poznań, Kraków, Warszawa, Lublin, Wrocław, Gdańsk), które utworzyły konsorcjum wykonawców, będące jego zasadniczym trzonem organizacyjno-merytorycznym, stanowiąc jednocześnie początek krajowej sieci laboratoriów referencyjnych hematologii molekularnej. Zamierzeniem autorów projektu było, aby działania konsorcjum stanowiły punkt wyjścia do powstania krajowej sieci ośrodków hematologii molekularnej, wzorowanej na narodowych sieciach istniejących już w innych krajach europejskich (np. Francji, Holandii, Włoszech, Niemczech). Taka forma organizacji zapobiegać ma rozprasaniu środków; jednocześnie z czasem sprzyjać może wypracowaniu pożądanej specjalizacji poszczególnych ośrodków, prowadzącej do unikania dublowania działań laboratoryjnych (specyficzne metody, techniki, urządzenia) w skali kraju. Taki system organizacyjny pozwala na:

- opracowanie wspólnego protokołu służącego prowadzeniu badań w sposób zunifikowany, zapewniający wysoki poziom jakości, wiarygodności i powtarzalności wykonywanych oznaczeń z zachowaniem maksymalnej czułości i o zminimalizowanym ryzyku otrzymania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych;
- opracowanie formuły pozwalającej na dokonywanie porównania wyników badania uzyskiwanych w różnych laboratoriach;
- wprowadzenie opracowanego standardu w laboratoriach rozpoczynających działalność lub posiadających mniejsze doświadczenie w tej dziedzinie i stworzenie możliwości szybszego dostosowania ich pracy do wymogów jakościowych;

- uniknięcie problemu interpretacji wyników badań prowadzonych za pomocą różnych protokołów metodycznych;
- stworzenie możliwości opracowania większego materiału klinicznego w wyniku współpracy wielośrodkowej.

Dobór badanych modelowych schorzeń hematoonkologicznych podyktowany został z jednej strony pewną specjalizacją ośrodków wchodzących w skład konsorcjum, wagą kliniczną wybranych jednostek chorobowych, posiadanymi kolekcjami materiału biologicznego oraz dostępnością warsztatu molekularnego w odniesieniu do zasadniczych zagadnień związanych z tymi schorzeniami. Te modelowe jednostki chorobowe, które stały się zasadniczymi obiektami zainteresowania w ramach projektu, to: ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL), ostra białaczka szpikowa dzieci i dorosłych (*acute myeloid leukemia*, AML), przewlekła białaczka szpikowa (*chronic myeloid leukemia*, CML) oraz nieziarnicze chłoniaki złośliwe (*non-Hodgkin lymphoma*, NHL). Szczegółowej analizie poddane zostały również zagadnienia związane z badaniami potransplantacyjnymi (chimeryzm hematopoetyczny, choroba resztkowa). Całość realizacji oparta została o planowo bankowany materiał biologiczny. Dane molekularne i kliniczne oraz informacje o bankowanym materiale zbierane były przy użyciu, specjalnie na potrzeby projektu skonstruowanych, komputerowych baz danych.

Realizacja projektu, w oparciu o przeprowadzone badania naukowe, równoległe do zasadniczego nurtu poznawczego projektu, umożliwiła także wypracowanie optymalnych w krajowych warunkach standardów hematologicznej diagnostyki molekularnej, które z czasem powinny stać się stałym elementem coraz powszechniej stosowanych nowoczesnych procedur diagnostyczno-terapeutycznych. Standardy takie, wypracowane przez konsorcjum w trakcie realizacji projektu, są rekomendowane w środowisku hematologów innym laboratoriom zajmującym się podobną tematyką. Zgodnie z oryginalnym założeniem standardy te zachowują pełną kompatybilność ze stosownymi standardami powszechnie przyjętymi w państwach Unii Europejskiej. Powinno to zapewnić polskiemu ośrodkom hematologicznym możliwość partycypacji, na zasadach pełnego partnerstwa merytorycznego, w paneuropejskich programach badawczych oraz programach diagnostyczno-terapeutycznych.

Całość doświadczeń uzyskanych w trakcie realizacji opisanego projektu zamawianego podsumowana została w wydanej w II połowie 2009 roku, nakładem poznańskiego Ośrodka Wydawnictw Naukowych (OWN), książce *Hematologia molekularna. Patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze*, pod redakcją prof. Michała Witta, doc. Tomasza Szczepańskiego i dr Małgorzaty Dawidowskiej. Książka ta, pierwsza monografia na polskim rynku książki naukowej poświęcona hematologii molekularnej (praca zbiorowa, 45 autorów), zawiera podsumowanie działalności badawczej prowadzonej w ramach projektu, rozszerzone o kilka zagadnień pokrewnych wykraczających poza jego ramy.

Części I-III zawierają eseje poświęcone tłu molekularnemu kilku wybranych jednostek hematoonkologicznych (ALL, AML, CML, NHL, czerwienicy prawdziwej, nadpłytkowości samoistnej, pierwotnemu zwłóknieniu szpiku) oraz aspektom molekularnym współczesnych sztanarowych procedur diagnostycznych (immunofenotypizacji metodą cytometrii przepływowej, cytogenetyce hematoonkologicznej, monitorowaniu minimalnej choroby resztkowej, analizie poprzyszczepowego chimeryzmu komórkowego, uwarunkowaniom genetycznym doboru pary dawca-biorca) i terapeutycznych (przeszczepienie allogenicznych macierzystych komórek krwiotwórczych). Część IV jest rozszerzoną i uaktualnioną wersją wydanego w roku 2007 skryptu zawierającego zasadnicze, i co najważniejsze, sprawdzone w polskich laboratoriach, podstawowe procedury laboratoryjne stosowane w hematologii molekularnej, z zasadami bankowania materiału biologicznego oraz uzyskiwania świadomej zgody pacjenta biorącego udział w badaniach włącznie. Skrypt ten spotkał się wtedy z dużym zainteresowaniem ze strony różnorodnych laboratoriów używających molekularnych metod diagnostycznych w odniesieniu do kliniki hematologicznej. Ta pozycja książkowa wydaje się godna polecenia zarówno lekarzom-klinicytom, pragnącym rozszerzyć swą wiedzę w zakresie molekularnych aspektów hematologii, jak i biologom oraz biotechnologom zajmującym się warsztatową stroną molekularnej diagnostyki medycznej, interesującym się kontekstem klinicznym używanych procedur.

Molecular hematology
– **modern methodology serving patients and research**

The article describes a country-wide attempt to organize a network of laboratories performing molecular diagnostic procedures in a context of clinical hematology. The principles of construction of a commissioned grant in molecular hematology are presented. A major result of this project, the monographic book on molecular hematology is being announced.

Key words: allogenic transplantation of hematopoietic stem cells, leukemia, lymphoma, minimal residual disease, posttransplant chimerism