

*Opšti pregledi/
General reviews*

SUDSKOMEDICINSKA GENETIKA U HEMATOLOGIJI: PROCENA HIMERIZMA NAKON TRANSPLANTACIJE KOSTNE SRŽI

FORENSIC GENETICS IN HEMATOLOGY: CHIMERISM ASSESSMENT AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION

Correspondence to:

Oliver Stojkovic, PhD
professor of Human Genetics
Head of DNA laboratory Institute of Legal
Medicine, School of Medicine,
University of Belgrade

tel. +381 113617931
mob. +381 63425396

ostojkovic@med.bg.ac.yu

Oliver Stojković¹, Aleksandra Krstić², Marija Guć-Šćekić², Dragana Vujić²

¹Institut za sudsku medicinu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija;
²Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić",
Beograd, Srbija

Ključne reči

Analiza grafta, himerizam, transplantacija kostne srži, STR-PCR, mikrosateliti

Key words

Engraftment analysis, chimerism, bone marrow transplantation, STR-PCR, microsatellites

Abstract

Standard DNA tests, based on multiplex PCR analyses of short tandem repeats (STRs), and widely used in forensic genetics for identification of human biological traces in criminal investigations, or in paternity testings, have been recommended by International Bone Marrow Transplant Registry 2001 as optimal methodological approach for engraftment analysis after bone marrow transplantation (BMT). Bone marrow transplantation is a medical procedure that involves transplantation of hematopoietic stem cells (HSC) for patients with inborn or acquired life-threatening diseases of the blood or bone marrow.

The main goal of post-transplantation monitoring in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is to predict negative events, such as disease relapse, graft rejection and graft-versus-host disease, in order to intervene with appropriate therapy. In this context, by quantifying the relative amounts of donor and recipient cells present in the peripheral blood sample, it can be determined if engraftment has taken place at all or if full or mixed chimerism exists.

ZNAČAJ HIMERIZMA U SUDSKOJ MEDICINI

Prema genetičkoj definiciji himerizam predstavlja pojavu dve ili više populacija genetički različitih ćelija u jednom organizmu. Himerizam može biti urođeno ili stečeno stanje. Urođeni, tzv. tetragametski himerizam, javlja se kao posledica fuzije dva embriona u ranim fazama razvika. U stečenom himerizmu matične ćelije jedne osobe bivaju unete u organizam medicinskom intervencijom: transfuzijom ili transplantacijom kostne srži. Himerizam se kod dvojajčanih blizanaca može javiti kao posledica razmene matičnih ćelija tokom intrauterinog razvika, preko anastomoza krvnih sudova.

Ovo odstupanje od standardne genetičke dogme da sva tkiva jednog organizma imaju isti genetički materijal ima svoj očigledni sudskomedicinski značaj. Utvrđivanje porekla biološkog materijala pronađenog na mestu zločina ili na predmetima koji se mogu dovesti u vezu sa izvršenim krivičnim delom sprovodi se na osnovu upoređivanja rezultata DNK analiza tog biološkog traga sa referentnim uzorkom uzetim od osobe osumnjene da je ostavila taj biološki trag. Pri tome se kao referentni uzorak najčešće uzima uzorak brisa bukalne sluznice. Poređenje dobijenih rezultata i izjašnjavanje o mogućem identitetu osobe koja je ostavila svoj biološki materijal zasniva se na pretpostavci da je genetički materijal identičan u ćelijama krvi, dlakama ili

semenoj tečnosti, sa jedne strane, i ćelijama sluzokože usne duplje, uzetim radi poređenja. Nepodudarnost ovih rezultata interpretira se kao isključenje mogućnosti da pronađeni biološki materijal potiče od testirane osobe (Stojković O., 2008).

Himerizam, kao redak genetički fenomen može imati za posledicu neočekivane rezultate i u slučajevima sudskomedicinskog veštačenja spornog roditeljstva. Jedan od najpoznatijih je slučaj žene koja je tokom svoje treće trudnoće, prilikom razvoda od muža, morala socijalnoj službi da dokazuje da je upravo njen muž biološki otac njene dece (Yu et al., 2002). Iako su DNK analize pokazale da njen muž jeste biološki otac dva starija deteta, socijalna pomoć joj je uskraćena jer su iste DNK analize pokazale da ona nije njihova majka. Na traćem porođaju ove žene optužene da je prevarom na osnovu tuđe dece htela da prisvoji socijalnu pomoć za sebe, prisustvovao je i sudski veštak koji je odmah po rođenju uzeo krv od novorođenčeta. DNK analize su je ponovo isključile kao majku i ovog deteta, a optužnica je izmenjena u prevaru na osnovu surogat materinstva. Preokret u sudskom postupku uneo je advokat optužbe, koji je posumnjao da se kod ove žene radi o himerizmu. I zaista, kada su nakon analiza sprovedenih na uzorcima krvi, dlaka i kože, koje su je sve isključivale kao biološku majku, analize ponovljene na uzorku brisa cervikalne sluzokože, dale su drugačije rezultate. Ne samo da su njena različita tkiva imala

različite genotipove, već je poslednje uzeti biološki uzorak potvrdio njeno biološko materinstvo nad svo troje dece.

U velikom broju kriminalističkih slučajeva, biološki materijal na mestu zločina predstavlja mešavinu ćelija poreklom od različitih osoba, učesnika u krivičnom delu. Neki od takvih slučajeva, kao što je na primer mešavina semene tečnosti napadača i ćelija epitela žrtve, mogu se razrešiti pre sprovođenja DNK analiza, primenom tehnika diferencijalne ekstrakcije DNK molekula iz različitih tkiva, ili fizičkim razdvajanjem različitih ćelija pod mikroskopom, primenom laserske mikrodisekcione tehnike. Mešavina krvi ili pljuvačke poreklom od dve osobe se međutim na ovaj način ne može tretirati. Dramatično visoka senzitivnost savremenih analitičkih tehnika zasnovanih na primeni PCR tehnologije, često dovodi do toga da se čak i analizom pojedinačnih mrlja krvi otkriva prisustvo minimalne količine ćelija poreklom od neke druge osobe. Ova situacija nametnula je potrebu za preciznom interpretacijom utvrđenih mešanih DNK profila u smislu pouzdane procene relativne zastupljenosti različitih ćelija, poreklom od različitih osoba, u mešanim biološkim tragovima (Clayton et al., 1998).

Rezultati ovog metodološkog i tehnološkog napretka u sudskomedicinskoj genetici brzo su našli primenu i u drugim granama medicine, pre svega u hematološkoj genetici i praćenju himerizma nakon transplantacije kostne srži (Krstić A. et al., 2007).

PRIMENA FORENZIČKIH METODA U HEMATOLOGIJI

Transplantacija alogernih pluripotentnih matičnih ćelija hematopoeze iz kostne srži predstavlja važnu terapijsku proceduru u velikom broju urođenih i stečenih hematoloških maligniteta. Mogućnost praćenja uspešnosti transplantacije kostne srži značajna je za predviđanje negativnih ishoda bolesti, kao što su relaps osnovne bolesti, odbacivanje kalem ili nastanak kalem-protiv-domaćina bolesti i od značaja je za pravovremenu primenu adekvatnih terapijskih i profilaktičkih protokola kod transplantiranih pacijenata. Kvantitativna analiza relativne zastupljenosti graftovanih matičnih ćelija u kostnoj srži pacijenta najneposrednije se može vršiti procenom relativnog broja krvnih ćelija primaoca i davaoca u perifernoj cirkulaciji. Stanje u kome se u perifernoj krvi pacijenta pojavljuju ćelije druge osobe označava se kao himerizam.

Ranije tehnike za procenu himerizma, zasnivane na metodama fenotipizacije antigena crvenih i belih krvnih zrnaca, analize izotipova imunoglobulina i citogenetičkim studijama, bile su ograničene stepenom polimorfnosti praćenih markera, malom senzitivnošću ili specifičnim zahtevima, kao što su razlika u polu između donora i recipijenta. Tako na primer, jedna od veoma senzitivnih tehnika, FISH za X i Y hromozom, mogla je da se primeni samo ukoliko su donor i recipijent različitog pola.

Savremeni pristup u proceni himerizma započeo je sa RFLP analizama bialelskih i minisatelitskih DNK markera. Iako je ova tehnologija omogućila metodološki pristup u analizi brojnih visoko polimorfnih genetičkih markera, mana RFLP tehnologije je bila u relativno velikoj količini potrebnog polaznog materijala, te niskoj senzitivnosti pri detekciji slabo zastupljenih ćelijskih populacija. Uvođenje PCR tehnologije za brzu, specifičnu i senzitivnu ampli-

fikaciju i analizu različitih genetičkih markera, omogućilo je prevazilaženje svih ovih problema i obezbedilo novi moćni pristup u proceni himerizma.

Savremeni pristup u proceni himerizma zasniva se na upotrebi fluorescentno obeleženih prajmera za PCR umnožavanje polimorfnih genskih lokusa, a kvalitativna i kvantitativna analiza umnoženih produkata u aparatima za automatsko sekvenciranje molekula DNK omogućuje preciznu procenu udela donorovih i recipijentovih alela u uzorku periferne krvi transplantovanog pacijenta. Iako se načelno različiti polimorfizmi (SNPs- singularni nukleotidni polimorfizmi, indels- inserciono delecioni polimorfizmi, STR- kratki uzastopni ponovci) mogu pratiti primenom ove tehnologije, Međunarodni registar transplantata kostne srži (IBMTR-International Bone Marrow Transplant Registry, 2001), preporučuje PCR analizu upravo mikrosatelitskih (STR) genskih lokusa u uzorcima periferne krvi pacijenata, budući da ovaj pristup predstavlja senzitivniji, reproducibilan i informativan postupak za procenu himerizma hematopoetskih tkiva. Čak i u slučaju kada su donor i pacijent najbliži srodnici, među analiziranim genskim lokusima može se pronaći više informativnih markera na kojima je moguće proceniti kvantitativno učešće donorskih alela u perifernoj cirkulaciji pacijenta.

U pilot studiji koja je sprovedena u saradnji Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "dr Vukan Čupić" i Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Beogradu, kojom je obuhvaćeno deset bolesnika, pokazali smo da multipleksovana (simultana) analiza 15 mikrosatelitskih genskih lokusa daje veoma vernu procenu stanja himerizma kod pacijenata nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze. Pouzdanost ove metode posebno je značajna kada su primalac i davalac najbliži srodnici, pošto se među analiziranim genskim lokusima može naći više informativnih markera koji omogućavaju procenu kvantitativnog prisustva alela davaoca u perifernoj cirkulaciji pacijenta. Sistem koji smo primenili istovremeno analizira i amelogenin, gen koji je u različitim alelskim varijantama prisutan na muškom i ženskom polnom hromozomu, što nam daje dodatne analitičke mogućnosti i kada su davalac i primalac različitog pola. Multipleksovana simultana analiza 15 mikrosatelitskih genskih lokusa kao i polno vezanih alelnih varijanti amelogenih gena radi utvrđivanja procentualne zastupljenosti alela davaoca u perifernoj krvi bolesnika sprovodi se u precizno definisanim vremenskim intervalima nakon učinjene transplantacije.

Na osnovu poznavanja genotipova donora i pacijenta pre transplantacije, donosi se zaključak o relativnoj procentualnoj zastupljenosti alelskih varijanti poreklom od donora i onih poreklom od recipijenta, u uzorku periferne krvi pacijenata posle transplantacije. Kao relativna mera količine amplifikovanog produkta, uzima se veličina površina ispod signala (peak area), iz softverskog paketa Genotyper. Na ovaj način, moguće je himerizam izraziti procentualno, uz standardnu grešku izračunatu na osnovu većeg broja informativnih genskih lokusa.

Iako se STR-PCR metoda koristi u mnogim laboratorijama u svetu za praćenje himerizma, do danas, nije formirana standardizacija vremenskih intervala kao ni tipova uzoraka za analizu. Još uvek se porede kliničke studije i diskutuje koliki je prognostički značaj mešanog himerizma za pojavu relapsa kod različitih hematoloških bolesti. Naš rad, uz

izvesne modifikacije, oslanja se na preporuke Američkog društva za transplantacije koje su objavljene 2001 godine nakon "workshop"-a u kome je učestvovao veći broj dijagnostičkih centara (Buno I. et al, 2005.; Antin et al., 2001).

Mnogobrojne studije su pokazale da upotreba STR-PCR metode omogućava veliku osetljivost, preciznost i brzo dobijanje rezultata (Hoelle W. et al., 2004). Osetljivost STR-PCR metode se kreće između 0.1% i 5% zbog same kompetitivne prirode metode lančanog umnožavanja molekula DNK. Korišćenjem multipleks metode (sa 16 genskih lokusa) povećava se preciznost kvantifikacije količine DNK u uzorku. Potencijalni problem kod STR analize su tzv. "stutter" signali, koji nastaju zbog proklizavanja replikacione mašinerije prilikom umnožavanja monotonih sekvenci koje sadrže uzastopne kratke ponovke. Budući da je problem nespecifičnih produkata amplifikacije najveći kod mikrosatelita sa di- i trinukleotidnim ponovcima, njihova upotreba se najčešće izbegava u ovom pristupu, već se preporučuje primena sudskomedicinsko genetičkih markera koji sadrže tetranukleotidne ponovke. Kod forenzički validiranih STR markera, stutter signali kraći su za svega jedan ponovak od "pravog" alela, a intenzitet stutter signala je u principu konstantan i dobro definisan za svaki genski lokus. Pored toga, u sistemima koji se koriste u sudskomedicinskoj genetici, primenjuje se tzv. multipleks pristup, koji omogućava da se simultano analizira veliki broj (10 do 15) mikrosatelitskih lokusa. Ovim pristupom povećava se šansa da se među analiziranim lokusima otkrije veći broj informativnih lokusa, koji se u različitim alelskim varijantama javljaju kod donora i pacijenta, te i da se izbegnu lokusi kod kojih nespecifični produkti PCR amplifikacije ometaju pravilnu interpretaciju rezultata (Schichaman et al. 2002; Antin et al. 2001).

PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ STR-PCR METODA ZA PRAĆENJE BOLESNIKA NAKON TRANSPLANTACIJE MATIČNIH ČELIJA HEMATOPOEZE

Praćenje pacijenata obolelih od malignih hematoloških bolesti u kraćim vremenskim intervalima STR-PCR metodom omogućava da se predvidi relaps i da se otkriju pacijenti sa najvećim rizikom da odbace kalem. Nažalost, u slučajevima kada je mali vremenski interval između pojave mešanog himerizma i pojave relapsa blagovremena intervencija nije moguća. Korelacija između himerizma i relapsa

je u nekim studijama potvrđena (Bader P. et al., 1996; Ramirez M. et al., 1996; Formankova R. et al., 2000; Gorezynska E. et al., 2004) dok u drugim nije potvrđena (Shatenberg A. et al., 1989; Suttrop M. et al., 1993; Schaap N. et al., 2002; Choi S.J. et al., 2000). Ove razlike se delimično mogu objasniti različitim protokolima za uzimanje uzoraka (Bader P. et al., 2005). Guimond i sar. su pokazali da mešani himerizam u različitim subpopulacijama ćelija hematopoeze može imati različit značaj za prognozu. Na primer mešani himerizam T ćelija i NK ćelija je dokazan kod pacijenata kod kojih je došlo do relapsa dok nije bio prisutan kod pacijenata koji su ušli u remisiju (Guimond M. et al., 2000). Analiza himerizma u različitim subpopulacijama ćelija hematopoeze značajno povećava senzitivnost analize i mogućnost prognoze kliničkog ishoda. Nasuprot, kod urođenih hematoloških bolesti (kao što su talasemija, aplastična anemija i dr.) stabilni mešani himerizam predstavlja dobru prognozu.

Praćenje himerizma STR-PCR metodama ima prognostički značaj u smislu da li je došlo do prihvatanja kalema, ali ne može služiti kao indirektni pokazatelj za postojanje minimalne rezidualne bolesti u slučaju hematoloških maligniteta. Detekcija minimalne rezidualne bolesti mora da bude specifična za određeni maligni klon i mora se pratiti analizom ćelija kostne srži. Prisustvo mešanog himerizma ne znači i obavezno prisustvo malignog klona, koji je moguće pratiti jedino korišćenjem specifičnih PCR tehnika ukoliko je pacijent pre transplantacije bio pozitivan na primer za neki fuzioni transkript ili je poznati TCR- ili IG- genski rearanžman kod ALL (van Dongen et al., 2003; Gabert et al., 2003; van der Velden et al., 2003). Dakle, kombinacija analize himerizma i analize minimalne rezidualne bolesti daje najbolje rezultate za procenu statusa post-transplantacione remisije i omogućava da se individualno kod svakog pacijenta izabere strategija za prevenciju negativnog ishoda (Bader P. et al., 2005).

Iz svih navedenih razloga, zaključujemo da su standardne forenzičke metode za identifikaciju osoba našle veoma značajnu primenu u praćenju hematoloških bolesnika nakon transplantacije matičnih ćelija hematopoeze.

Apstrakt

Standardne DNK analize koje se uobičajeno koriste u sudskomedicinskoj genetici, bilo u cilju identifikacije bioloških tragova ljudskog porekla u okviru kriminalističkih istraga, bilo za utvrđivanje spornih srodničkih odnosa, zasnivaju se na simultanim analizama većeg broja mikrosatelitskih (STR) genskih lokusa, primenom PCR metode. Međunarodni Registar za Transplantaciju Kostne Srži je 2001 godine predložio upravo ovaj pristup kao metodološki optimalan način za praćenje uspešnosti transplantacije kostne srži. Transplantacija kostne srži je medicinska procedura koja uključuje transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze kod pacijenata sa urođenim ili stečenim hematološkim oboljenjima. Glavni cilj post-transplantacionog monitoringa u transplantaciji matičnih ćelija hematopoeze je predviđanje negativnog ishoda, kao što je relaps bolesti, odbacivanje kalema i bolest kalem-protivdomaćina. U tom smislu, kvantifikacija relativne zastupljenosti ćelija donora i pacijenta prisutnih u perifernoj cirkulaciji pacijenta nakon transplantacije, može poslužiti da se ustanovi prihvatanje kalema, odnosno da se proceni da li postoji puni ili mešani himerizam.

LITERATURA

1. Stojković O. Sudskomedicinska genetika. U: Ekspertizna medicina Urednik: Dušan J. Dunjić, Izdavači: Evropski centar za mir i razvoj (ECPD), Beograd i Pravosudni centar, Beograd, 2008.
2. Yu N, Kruskall MS, Yunis JJ, Knoll JH, Uhl L, Alosco S, Ohashi M, Clavijo O, Husain Z, Yunis EJ, Yunis JJ, Yunis EJ. Disputed maternity leading to identification of tetragametic chimerism. *N Engl J Med.* 2002;16:346(20):1545-52
3. Clayton T.M. Whitaker J.P., Sparkes R., Gill P. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling *Forensic Science International* 91 (1998) 55-70
4. Krstić, A., Stojković, O., Guć-Šćekić, M., Vujić, D., Jevtić, D., Varljen, T. Hematopoietic stem cell transplantation monitoring in childhood hematological diseases in Serbia: STR-PCR techniques. *Arch. Biol. Sci.*, 59 (1), 23-27, 2007.
5. Buno I., Nava p., Simon A., Gonzalez-Rivera M., Jimenez J.L., Balsalobre P., Serrano D., Carrion R., Gomez -Pineda A., Diez-Martin J.L. (2005). A comparison of FISH and multiplex STR PCR quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica*; 90(10):1373-1379.
6. Antin J.H, Childs R., Filipovich A.H., Giralt S., Mackinnon S., Spitzer T., Weisdorf D. (2001). Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic Transplantation: Recommendations from workshop at the 2001 tandem meetings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 7:473-485
7. Hoelle W., Beck JF., Dueckers G., Kreyenberg H., Lang P., Gruhn B., Fuhrer M., Niethammer D., Klingebiel T., Bader P.,: Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* (2004) 33,219-223.
8. Bader P., Hoelle W., Klingebiel T., (1996): Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res*, 16:1759-1763.
9. Ramirez M., Diaz MA., Garcia-Sanchez F.,(1996): Chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 18: 1161-1165.
10. Formankova R., Honzatkova L., Sieglova Z., (2000): Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 25:453-456.
11. Gorezynska E., Turkiewicz D., Toporski J.,(2004): Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce complete donor-type chimerism: report of 14 children. *Bone Marrow Transplantation*, 33:211-217.
12. Shattenberg A., de Witte T., Salden M., (1989): Mixed after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood*, 73: 1367-1372.
13. Suttrop M., Shmitz N., Dreger P.,(1993): Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia*, 7:679687.
14. Schaap N., Shattenberg A., Mensink E., (2002): Long term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 16:13-21.
15. Choi SJ., Lee KH., Lee JH., (2000): Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplantation*, 26: 327-332.
16. Bader P., Niethammer D., Kreyenberg H. Klingebiel T.,(2005): How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation*, 35,107-119
17. van Dongen JJ., Langerak AW., Bruggemann M.,(2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17: 2257-2317.
18. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.,(2003): Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase PCR of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer programme. *Leukemia*, 17: 2318-2357.
19. van der Velden VH., Hochhaus A., Cazzaniga G.,(2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches and laboratory aspects. *Leukemia*, 17:1013-1034.