

## Detekce volné DNA v plazmě v transplantologii. Možnosti a úskalí\*

Jaroslav A. Hubáček<sup>\*,\*\*</sup>, Ivan Málek<sup>\*\*\*</sup>, Yevgenie Vymětalová<sup>\*\*\*</sup>, Romana Bohuslavová<sup>\*,\*\*</sup>,  
Miroslav Kocík<sup>\*\*\*\*,\*\*\*\*\*</sup>

*\*Pracoviště experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, \*\*Centrum výzkumu chorob srdce a cév, \*\*\*Klinika kardiologie, Institut klinické a experimentální medicíny, \*\*\*\*IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika*

Hubáček JA<sup>\*,\*\*</sup>, Málek I<sup>\*\*\*</sup>, Vymětalová Y<sup>\*\*\*</sup>, Bohuslavová R<sup>\*,\*\*</sup>, Kocík M<sup>\*\*\*\*,\*\*\*\*\*</sup> (\*Pracoviště experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, \*\*Centrum výzkumu chorob srdce a cév, \*\*\*Klinika kardiologie, Institut klinické a experimentální medicíny, \*\*\*\*IV. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika). **Detekce volné DNA v plazmě v transplantologii. Možnosti a úskalí.** *Cor Vasa* 2008;50(9):322–327.

**Cíl studie:** Analyzovat možnosti detekce volné DNA v plazmě, jako ukazatele akutní rejekce u pacientů po transplantaci srdce, a ověřit využití metody pro diagnostické účely.

**Metodika:** Pomocí metody řetězové polymerázové reakce (PCR) jsme analyzovali přítomnost různých úseků DNA v plazmě u pacientů po transplantaci srdce.

**Výsledky:** Na několika ukazatelích DNA jsme prokázali, že citlivost analýzy PCR není dostatečná (detekce ředění je maximálně okolo 1 : 50) pro průkaz nízké koncentrace dárcovské DNA v plazmě příjemce v případě použití forenzních markerů či běžných dvoualelických polymorfismů. Prokázali jsme asi 40% přítomnost Y chimerismu v tkáních získaných z ženských aort, což dále snižuje možnost použití PCR pro specifickou detekci volné DNA. Nicméně, použití nested PCR umožní detekci volné DNA (v případě analýz nekompetujících úseků DNA) dárcovského původu i při ředění 1: 1 000 000.

**Závěr:** Vzhledem k nízké citlivosti PCR pro danou aplikaci a vysoké míře chimerismu je nepravděpodobné, že by detekce pomocí volné DNA mohla být v blízké budoucnosti použita k rutinnímu vyšetření akutní rejekce.

**Klíčová slova:** Volná DNA – PCR – Transplantace srdce – Akutní rejekce

Hubáček JA<sup>\*,\*\*</sup>, Málek I<sup>\*\*\*</sup>, Vymětalová Y<sup>\*\*\*</sup>, Bohuslavová R<sup>\*,\*\*</sup>, Kocík M<sup>\*\*\*\*,\*\*\*\*\*</sup> (\*Center of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, \*\*Cardiovascular Research Center, \*\*\*Department of Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, \*\*\*\*Department of Internal Medicine IV, General University Hospital and Charles University School of Medicine 1, Prague, Czech Republic). **Detecting free plasma DNA in transplant medicine. Possibilities and pitfalls.** *Cor Vasa* 2008;50(9):322–327.

**Aim of study:** To evaluate the possibility of detecting free DNA (as a marker of acute rejection) in the plasma of patients after heart transplantation.

**Methods:** Using PCR, different genetic markers were analyzed in the plasma of patients undergoing heart transplantation.

**Results:** Using several genetic markers, we have shown that PCR is not sensitive enough (detecting dilution max ~ 1 : 50) to demonstrate low levels of free plasma DNA of donor origin in cases where forensic markers or diallelic polymorphisms are used. In the tissue of female aortas, Y chromosome-specific DNA was shown to be present in ~ 40% of cases.

**Conclusions:** Given the low sensitivity of the method used and high prevalence of chimerism, free plasma DNA is unlikely to be used for routine detection of acute rejection in the near future.

**Key words:** Free DNA – PCR – Heart transplantation – Acute rejection

**Adresa:** Ing. Jaroslav A. Hubáček, CSc., Pracoviště experimentální medicíny, IKEM, Vídeňská 1958/9, 14021 Praha 4, Česká republika, e-mail: jahb@ikem.cz

### Úvod

Ortotopická transplantace srdce (OTS) představuje zavedenou metodu léčby terminální fáze srdečního selhání. První transplantace byla provedena před 40 lety,<sup>(1)</sup> v současné době se registruje ve světě asi

4000 výkonů ročně. V IKEM byla v období od ledna 1984 do ledna 2008 OTS provedena u 672 nemocných s výsledky srovnatelnými se světovými registry: roční přežívání dosahuje 80% a pětileté 50%.<sup>(2)</sup> V posttransplantačním průběhu se setkáváme s řadou komplikací, z nichž mezi významné patří odhojování

\*Tato práce byla podpořena grantem č. 8547-3/2005, IGA MZ ČR.

(rejekce) štěpu. Tato komplikace představuje společně s infekcemi, nádory a koronární nemoci štěpu nejčastější příčinu morbiditu a mortality nemocných po OTS.<sup>(3)</sup> Do jednoho roku po OTS je akutní rejekce vedle infekcí dokonce vedoucí příčinou morbiditu a mortality příjemců.<sup>(2)</sup>

Diagnostika rejekce je založena na hodnocení vzorků získaných při endomyokardiální biopsii (EMB), kterou je nutno provádět opakovaně, v časném období po transplantaci v krátkých (jeden týden až jeden měsíc) časových intervalech. Metoda je invazivní, představuje diskomfort a zátěž pro pacienta a její provádění není zcela bez rizika. Vyšetření vzorku myokardu nepostihuje všechny aspekty procesu rejekce a dokumentuje pouze momentální stav bez možnosti posoudit vývoj v mezidobí. Rejekce nemusí postihnout štěp rovnoměrně, získané vzorky z několika míst endomyokardu nemusejí nutně proces zachytit. Vzhledem k těmto kritickým výhradám k EMB se intenzivně hledají možnosti jiné, pokud možno neinvazivní diagnostiky rejekce štěpu.<sup>(4,5)</sup>

Jednou z teoretických možností detekce akutní rejekce (AR) by mohlo být sledování přítomnosti volné nebuněčné DNA (vDNA) dárcovského původu v séru jedinců s OTS. Dárcovská DNA se může uvolnit do oběhu příjemce po zániku buňky štěpu (nekróza, apoptóza) v průběhu AR podobně, jako jsou v průběhu AR uvolňovány např. troponiny a isoformy kreatin-kinázy, jejichž senzitivita a specifita však není podle jednotlivých studií uspokojivá.<sup>(6)</sup>

Očekávanou výhodou oproti EMB je kromě neinvazivního charakteru vyšetření zejména to, že vDNA dárce v séru příjemce by mohla citlivěji odrážet rozsah poškození myocytů v celém srdečním štěpu. Oproti ostatním laboratorním technikám se předpokládalo, že tato metoda by se měla vyznačovat vyšší senzitivitou (danou metodikou vyšetření – řetězová polymerázová reakce [PCR]) a relativně vyšší orgánovou specificitou (bude odrážet poškození tkání obdržené dárce – v tomto případě srdečního štěpu).

Cílem práce bylo posoudit možnost detekce vDNA dárcovského původu v krvi příjemce (vDNA chimerismus) pomocí metody PCR. V případě pozitivní identifikace vDNA jsme plánovali posoudit vztah mezi přítomností vDNA a nálezem rejekce štěpu, tedy korelace s výsledkem biopsie.

## METODIKA

### Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno celkem 96 (82,8%) z celkového počtu 116 nemocných, u nichž byla v IKEM provedena ortotopická transplantace srdce (OTS) v letech 2005–2007. U všech nemocných byla použita bikavální technika OTS. Sedmdesát sedm pacientů (80%) bylo operováno v urgentním pořadí, z toho 22 na mechanické srdeční podpoře. Základní charakteristika souboru příjemců a dárců je uvedena v *tabulce I*. V průběhu sledování zemřelo osm pacientů (8,3%) za 6 týdnů až 23 měsíců po operaci.

Vyšetření nemocného, příprava, vlastní provedení transplantace i následná péče – vše se provádělo podle zavedených pravidel programu OTS, který se v IKEM uskutečňuje od roku 1984.<sup>(7)</sup> Všichni nemocní byli v době vyšetření, před zařazením na čekací listinu,

**Tabulka I**  
Základní charakteristika dárců a příjemců

<b>Příjemci</b>			
Pohlaví (M/Ž)	70/26		
Průměrný věk (věkové rozmezí)	48,8	18–74	
Základní diagnóza	ICHS	36	37,5 %
	DKMP	48	50,0 %
	Ostatní (RCHS, VVS)	12	12,5 %
<b>Dárci</b>			
Pohlaví (M/Ž)	76/20		
Průměrný věk (věkové rozmezí)	38	13–60	

ICHS – ischemická choroba srdeční, DKMP – dilatační kardiomyopatie, RCHS – revmatická choroba srdeční, VVS – vrozená vada srdeční

seznámení s protokolem studie a podepsali informovaný souhlas.

### Endomyokardiální biopsie

Protokolární EMB byly prováděny podle následujícího schématu:

<b>Doba od OTS</b>	<b>Intervaly EMB</b>
0–1 měsíc	jednou týdně
1–3 měsíce	dvakrát měsíčně
3–6 měsíců	jednou měsíčně
6–12 měsíců	po třech měsících

Během sledování bylo provedeno celkem 1156 endomyokardiálních biopsií. Výskyt epizod buněčné rejekce je uveden v *tabulce II*. Stupeň rejekce jsme hodnotili podle Banffské klasifikace.<sup>(8)</sup>

### Odběry vzorků, izolace a zpracování DNA

V době transplantace byly odebrány vzorky tkáně z aort dárce i příjemce srdce. Vzorky periferní krve k analýze přítomnosti vDNA dárcovského původu byly odebírány v den EMB, vždy před provedením tohoto vyšetření.

Jaderná DNA dárců i příjemců byla izolována z aortálních vzorků pomocí vysolovací metody.<sup>(9)</sup>

Plná krev byla centrifugována 10 minut při 3500 rpm (rotations per minute). Získaná plazma byla recentrifugována dalších 10 minut za stejných podmínek. Vrchních 200 µl plazmy bylo použito k izolaci volné DNA pomocí kitu Nucleospin Blood Quick Pure (Macherey-Nagel, Duren, Německo). Úspěšnost

**Tabulka II**

Výskyt epizod buněčné rejekce (podle Banffské klasifikace)

	<b>N</b>	<b>%</b>
Bez rejekce	43	44,8
1 epizoda Banff 2	19	19,8
> 1 epizoda Banff ≥ 2 a/nebo opakované rejekce	34	35,4

izolace DNA byla prokázána amplifikací části genu pro interleukin-6.

### Zpracování vzorků

Z důvodu vyloučení možnosti kontaminace v případě analýz přítomnosti chromosomu Y byly vzorky zpracovávány pouze ženami-laborantkami. Z obdobných důvodů byly používány výhradně sterilní špičky s filtrem a experimenty byly připravovány ve sterilním boxu (sterilizování UV zářením). Analýzy byly provedeny dvakrát v různou dobu, abychom minimalizovali možnost falešně pozitivních/negativních výsledků a v případě neshody byly analýzy opakovány.

### Metodiky PCR pro detekci různých alel DNA

Pro analýzu senzitivity metody PCR pro detekci různých alel DNA jsme použili dvě varianty DNA:

1. Polymorfismus VNTR (variable number of tandem repeat) v genu pro NOS
2. C-572G variantu v genu pro interleukin-6

Pro analýzu přítomnosti akutní rejekce pak markery:

1. chromosom Y
2. polymorfismus inserce/delece [I/D] v genu pro angiotensin konvertující enzym [ACE]
3. RH faktor
4. markery S01, S05 a S10
5. RS – 284
6. IL-RA VNTR

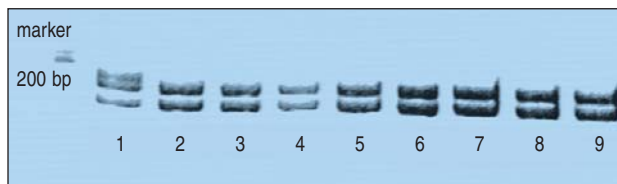
Chemikálie PCR byly použity od firmy Fermentas (Burlington, Kanada) a základní protokol PCR byl následující: směs PCR sestávala z (celkový objem 25  $\mu$ l) 1krát PCR pufr, 0,2 mmol/l každého nukleotidu, 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 0,1 U Taq DNA polymerázy, 1 pmol/l primerů a  $\sim$ 1  $\mu$ l DNA (20–100 ng). DNA byla amplifikována na přístroji PCR Dyad (MJ Research, Waltham, USA) za následujících podmínek: počáteční denaturace 96 °C (3 min); následujících 35 cyklů 95 °C (15 s), annealing 72 °C (30 s). Annealing pro jednotlivé metody a sekvence použitých oligonukleotidů jsou shrnuty v tabulce III, PCR byla ukončena amplifikačním krokem 72 °C (3 min).

Pro analýzu markerů na chromosomu Y a v genech pro ACE a Rh faktor byla použita metoda nested PCR.

### VÝSLEDKY

Na několika ukazatelích DNA jsme prokázali, že citlivost analýzy PCR není dostatečná (detekce ředění maximálně okolo 1 : 50) pro průkaz nízké koncentrace dárcovské DNA v plazmě příjemce v případě použití forenzních markerů (obrázek 1) či běžných dvoualelických polymorfismů.

Pro analýzu pomocí inserce/delece [I/D] jsme vybrali v kardiologii často sledovanou variantu v genu pro ACE.<sup>(10)</sup> Při analýze dárců a příjemců se však ukázalo, že z celkového počtu 96 vyšetřených pouze 11 jedinců s genotypem DD obdrželo srdce s alespoň jednou alelou I. U jediného z nich byla prokázána rejekce. Celkem sedm nositelů genotypu DD pak obdrželo srdce s alespoň jednou alelou I. U žádného z těchto pacientů se však neobjevily známky akutní rejekce (stupeň 3). Navíc, povaha DNA v oblasti va-



Obr. 1 Sériové ředění DNA od dvou odlišných genotypů NOS; při ředění 1 : 25 ředěná DNA není detekovatelná (1–1 : 5, 2–1 : 25, 3–1 : 50, 4–1 : 100, 5–1 : 200, 6–1 : 500, 7–1 : 1 000, 8–1 : 10 000, 9–1 : 100 000)

rianty I/D genu pro ACE („Alu repeat“) vedla při některých kontrolních vyšetřeních k falešně pozitivním výsledkům.

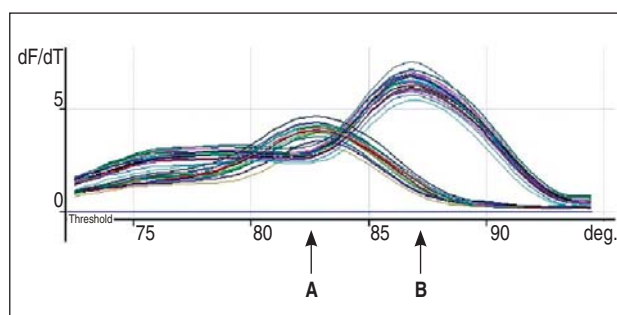
Dalším nadějným analyzovaným ukazatelem byla analýza přítomnosti části genu, který určuje Rh pozitivitu/negativitu. I zde bylo vhodných kandidátních pacientů pouze sedm a podobně nízké počty by se daly použít pro analýzu dalších markerů (S01, S05, S10 a RS 284).<sup>(11)</sup>

Přítomnost specifické sekvence Y byla analyzována pomocí „nested-real-time“ PCR ve vzorcích aort explantovaných a transplantovaných ženských srdcí; tuto sekvenci jsme prokázali u 19 z celkem 40 analyzovaných vzorků (příklady ukazuje obrázek 2). Chimerismus byl častěji přítomen v aortách transplantovaných (dárce – jedenáct orgánů ze 17 analyzovaných, 65,7%) než v aortách explantovaných (příjemce – osm orgánů z 23, 34,8%). Nalezli jsme tendenci k vyššímu výskytu rejekčních epizod u dárců s nálezem specifické sekvence Y, rozdíl však nebyl statisticky významný (tabulka IV).

### DISKUSE

Přítomnost velkého množství nebuněčné (volné) DNA (vDNA chimerismus) v krvi člověka byla poprvé prokázána u nemocných s některými nádorovými onemocněními.<sup>(12)</sup> Následně byla prokázána přítomnost vDNA chimerismu i u gravidních žen<sup>(13,14)</sup> a v současné době je známo, že přítomnost vDNA v séru (i když v nízké koncentraci) je běžný fenomén, detekovatelný i u zdravých jedinců.<sup>(15)</sup>

Použití metody PCR, kdy dochází k mnohařádkovému zmnožení hledaného úseku DNA, se zdálo nadějným prostředkem k získání informace o přítomnosti



Obr. 2 Přítomnost specifické sekvence Y byla analyzována pomocí PCR „nested-real-time“ ve vzorcích aort explantovaných a transplantovaných ženských srdcí

A – vzorky bez prokázaného chimerismu Y, B – vzorky s prokázaným chimerismem Y

**Tabulka III**  
Oligonukleotidy a PCR charakteristiky použitých metod

<b>Gen</b>	<b>Primery</b>	<b>Teplota annealingu (°C)</b>
NOS	F 5'ACCCCTGGAAGCCTACAACATGCAT R 5'GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA	70
ACE	F 5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT R 5'GACGTGGCCATCACATTCGTCAGA	62
ACE Inserce Nested PCR	F 5'TTAGTAGAGACGGGTTTACCGTTTATAGCC R 5'TGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGG	70
ACE Delece	F 5'AAGCACGCCCCCTACAGGACTGC R 5'AAAAGTGACTGTATAGGCAGCAGGTGT	63,9
ACE Delece Nested PCR	F 5'TCTGCAGCATGTGCCAGGCCG R 5'GTATAGGCAGGTGTAGAGAAATGGG	66
SEX-Y	F 5'CGCATTCATCGTGTGGTCTCG R 5'TTTTCGGCTTCAGTAAGCATTTTCC	57
SEX-Y Nested PCR	F 5'TCAGAGGCGCAAGATGGCTC R 5'AGTAAGCATTTTCCACTGGTATCCC	57
RH faktor	F 5'AAGTTCCCTGGGTGTCTGAAGCCCTTCCATC R 5'TCTCCCCTCCGAGCTCTCAAGCTGATACC	55
RH faktor Nested PCR	F 5'AAGCCCTTCCATCATGATTCATTTCTTTG R 5'TACCAGCTAACCACATTTTACAGACAAGG	55
RS-284	F 5'AGCCACTAAACCTCAGAGACATACATA R 5'AACCAGCTTACAGACACAATCCAC	60
RS-284 Nested PCR	F 5'ACAAACCTATGGGTTAGC R 5'AGATCCACTATGCCTAATCC	57
S01A F1R	F 5'GGTACCGGGTCTCCACATGA R 5'GGGAAAGTCACTACCCAAGG	57
S01A F2R	F 5'GTACCGGGTCTCCACCAGG R 5'GGGAAAGTCACTACCCAAGG	57
S05A F1R	F 5'AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG R 5'CATCCCCACATACGGAAGA	57
S05A F2R	F 5'AGTTAAAGTAGACACGGCCTCCC R 5'CATCCCCACATACGGAAGA	57
S10A F1R	F 5'GCCACAAGAGACTCAG R 5'TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT	57
S10A F2R	F 5'TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG R 5'TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT	57
IL-RA	F 5'CTCAGCAACACTCCTAT R 5'TCCTGGTCTGCAGGTAA	52
IL-RA Nested PCR	F 5'CCTATTGACCTGGAGCACAG R 5'AGGTAAATAGAAGATTAAACC	55

cizorodé DNA. Nicméně, jak jsme popsali dříve (analýzou uměle připravených směsí produktů PCR, obsahujících různé alely v jiném poměru než 1 : 1), možnost spolehlivé detekce méně koncentrované alely končí přibližně při ředění 1 : 10 až 1 : 50.<sup>(16)</sup> Podobné výsledky byly revidovány recentně i jinými autory,<sup>(17)</sup> a zdá se tak, že použití variant VNTR pro diagnostiku

AR nebude možné při použití současných metod molekulární genetiky.

Problém kompetice úseku DNA při PCR však odpadá v případě, že by k detekci akutní repekce byly použity přísně specifické úseky DNA. Opakovaně je využívána detekce specifických úseků chromosomu Y, pokud je příjemcem mužského srdce žena. Takové



**Tabulka IV**  
Výskyt rejekčních epizod; u dárců s prokázanou přítomností specifické sekvenční Y jsme našli nevýznamnou tendenci k vyššímu výskytu

	N		Akutní rejekce (Banff 2–4)	Bez rejekce	
<b>Dárce</b>	17	Y pozitivní	63,7%	36,3%	NS
		Y negativní	33,7%	66,3%	
<b>Příjemce</b>	23	Y negativní	50%	50%	NS
		Y pozitivní	35,7%	64,3%	

případy však jsou relativně málo časté. Teoreticky je však možné využít především varianty genů I/D, kdy příjemce s oběma delecemi alelami dostane srdce s alespoň jednou alelou inserční, nebo s oběma alelami inserčními dostane alespoň jednu alelu delecí.

Popsali jsme, že v případě analýzy sekvenční specifické pro chromosom Y je skutečně možné detekovat přítomnost vDNA v případě akutní rejekce orgánu.<sup>(16)</sup> I tato metoda však má, jak se ukázalo, svá nečekaná úskalí daná přítomností tkáňového chimerismu.<sup>(17,18)</sup>

Chimerismus je stav, kdy v jednom organismu jsou přítomny buňky jiného organismu. Pokud množství těchto „cizorodých“ buněk překročí jedno procento, hovoří se o chimerismu; v případě (mnohem častěji se vyskytující) nižší frekvence se hovoří o mikrochimerismu. Původcem chimerismu mohou být především aplikované transfuze a prodělané (i nedokončené) gravidity.

Různě vysoká míra chimerismu v různých orgánech byla prokázána i jinými autory za použití jiných markerů DNA. Zdá se tak, že použití detekce volné DNA v plazmě při analýze orgánové rejekce nebude dávat spolehlivé výsledky. Přítomnost chimerických buněk v tkáních dárce, ale i příjemce, výrazně snižují výpovědní hodnotu analýzy volné DNA.

Fenomén chimerismu může mít vliv i na rozvoj tolerance štěpu. Dříve jsme ukázali, že dlouhodobé křivky přežívání ženských příjemců srdce jsou příznivější než u příjemců pohlaví mužského.<sup>(2)</sup> Tento rozdíl není dosud spolehlivě vysvětlen. Lze spekulovat, že zlepšené přežívání souboru žen způsobuje podskupina s přítomností tkáňového chimerismu, která je zvýhodněna proto, že chimerismus zde funguje jako určitá forma „imunologického preconditioningu“. Naopak je známo, že osud štěpu od dárců ženského pohlaví je obvykle horší než od dárců pohlaví mužského. Zde by mohla hrát roli větší zátěž cizorodým genetickým materiálem v podskupině „chimerických“ dárců. Tyto skutečnosti jsou náměty pro další výzkum, který by mohl přispět k řešení extrémně důležité otázky tolerance štěpu po orgánových transplantacích.<sup>(19)</sup>

Využití metody polymerázové reakce v diagnostice rejekce půjde pravděpodobně jinou cestou. V poslední době se objevují práce, které analyzují expresi definovaných genů (v leukocytech), jež mají vztah k aktivaci imunitního procesu a nálezy korelují s výskytem rejekce (metoda „Gene Expression Profiling“ (GEP) – AlloMap.<sup>(20)</sup> Pro tyto účely bylo definováno jedenáct kandidátních genů, u kterých je známo, že se účastní různých fází aktivace imunitního procesu a vzniku rejekce štěpu. Dosavadní výsledky ukázaly,

že přítomnost/nepřítomnost exprese této skupiny genů dovolí rozlišit pacienty bez rejekce od těch, kde je přítomna rejekce vyššího stupně ( $\geq 3A$  podle Banffské klasifikace); ROC 0,80 pro období > šest měsíců a 0,86 > jeden rok po transplantaci. Z praktického hlediska je především podstatná velmi vysoká spolehlivost (> 99%) detekce nepřítomnosti střední nebo těžké rejekce u pacientů, kteří jsou déle než jeden rok po transplantaci. To by dovolilo zcela opustit režim protokolárních biopsií. Metoda byla ověřována ve větší klinické studii (Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational – CARGO Study). Na základě výsledků byl navržen model sledování rejekce doporučovaný u stabilních pacientů, kteří jsou více než dva měsíce po transplantaci.<sup>(21)</sup>

V současné době probíhá ve třinácti transplantacích centrech v USA a Evropě další velká studie, která předpokládá zařazení 500 pacientů (CARGO II). Cílem je zodpovědět otázky, které vznikly po zpracování výsledků předchozí studie, např. prediktivní hodnota vysokého skóre exprese pro následný vznik rejekce, detekce humorální rejekce a koronární nemoci, zhodnocení podskupiny s vysokým skóre exprese a negativní biopsií, vliv individuálních imunosupresivních protokolů. Konečným cílem je zjistit, zda imunosupresivní profylaxe vedená podle výsledků metody GEP zlepšuje klinický průběh v oddáleném období po transplantaci, který se přes veškeré pokroky dosud nedaří uspokojivě ovlivnit.

## ZÁVĚR

Podle současných poznatků a s využitím recentních metod se zdá, že analýza volné DNA dárcovského původu v plazmě příjemce nebude vhodnou metodou pro analýzu akutní rejekce po transplantaci srdce. Forenzní analýza naráží na vzájemnou kompetici vysoce variabilních úseků DNA během PCR. Použití analýz nekompetujících sekvencí z I/D variant by nutně znamenalo analýzu minimálně deseti různých markerů. Základním předpokladem by pak bylo i vyloučit (nebo přesně charakterizovat) jakýkoli chimerismus jak u dárce, tak u příjemce. To by zkomplikovalo předtransplantační vyšetření a počet jedinců, kde by obě tato vyšetření byla negativní, by patrně nepřekročil 10% pacientů.

## LITERATURA

1. Málek I. Čtyřicet let od první transplantace srdce. *Cor Vasa* 2007;49:445.
2. Dorazilová Z, Málek I, Pirk J, a spol. Program transplantace srdce v IKEM v období od 31. 1. 1984 do 31. 5. 2005. *Cor Vasa* 2007;48:98–107.
3. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-second official adult heart transplant report-2005. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:945–55.
4. Fridl P, Urbanová D, Janota M, a spol. Neinvazivní diagnostika rejekce myokardu pomocí echokardiografie. *Cor Vasa* 1993;35:247–50.
5. Vymětalová Y, Málek I. Akutní rejekce po transplantaci srdce. *Kardiolog* 2005;3:12–5.
6. Mehra MR, Uber PA, Ber WE, et al. Anything but a biopsy: noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:131–6.

7. Málek I. Transplantace srdce. Pohled kardiologa. 1. vyd. Praha: Triton, 2004:108.
8. Billingham ME, Cary NR, Hammond ME, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant 1990;9:587-93.
9. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1988;16:1215.
10. Hubáček JA, Poledne R. Inzerční/deleční polymorfismus v genu pro angiotenzin konvertující enzym a kardiovaskulární onemocnění. Cor Vasa 1999;41:149-54.
11. Aliyadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood 2002;99:4618-25.
12. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977;37:646-50.
13. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350:485-7.
14. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768-75.
15. Koopmans M, Hovinga ICLK, Baelde HJ, et al. Chimerism in kidneys, livers and hearts of normal women: implications for transplantation studies. Am J Transplant 2005; 5:1495-502.
16. Hubáček J, Vymetalova Y, Bohuslavova R, Kocik M, Malek I. Detection of donor DNA after heart transplantation: how far could it be affected by blood transfusion and donor chimerism. Transplant Proc 2007;39: 1593-5.
17. Krist D, Stein J, Zaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. Bone Marrow Transplantation 2007;39:255-68.
18. Kocik M, Vymetalová Y, Málek I. Volná (nebuněčná) lidská DNA v tělních tekutinách – možnosti klinického využití. Čas Lék čes 2007;146:96-101.
19. Claas F. Chimerism as a tool to induce clinical transplantation tolerance. Current Opinion in Immunology 2004;16:578-83.
20. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. Am J Transplant 2006;6:150-60.
21. Starling RC, Pham M, Valantine H, et al. Molecular testing in the management of cardiac transplant recipients: initial clinical experience. J Heart Lung Transplant 2006;25:1389-95.

*Došlo do redakce 27. 3. 2008*

*Přijato k otištění 30. 4. 2008*