

FAGLIG

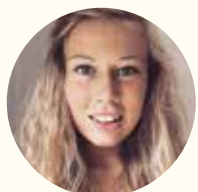
Der udføres blot 12 test for **HÆMOFAGOCYTISK LYMFOHISTIOCYTOSE** om året i Danmark, men analysens diagnostiske anvendelighed har stor betydning for patienter og pårørende

Analyser til udredning af sjældne sygdomme skal også prioriteres

ARTIKLEN
ER SKREVET AF:



METTE BRUUN
Bioanalytiker, Patologi,
Regionshospitalet Viborg



KATRINE RAFN JOSIASEN
Bioanalytiker, Patologi,
Aarhus Universitetshospital



MARIE NØRKJÆR LARSEN
Bioanalytiker, Klinisk
Mikrobiologi, Aarhus
Universitetshospital

En NK-funktionstest er ikke en analyse, som mange har kendskab til. Den udføres få gange årligt på specialiserede afdelinger i Danmark, men denne NK-funktionstest er yderst vigtig for patienter med den sjældne immundefekt Hæmfagocytisk Lymfocytose.

Vi arbejdede med udvikling og kvalitetssikring af denne NK-funktionstest som vores bachelorprojekt med inspiration fra et børnehospital i London og et hospital i Mumbai.

Når immunforsvaret svigter

Blodbank og Immunologi på Aarhus Universitetshospital er et af få laboratorier i Danmark, der udfører en funktionstest af natural killer (NK)-celler. Denne NK-funktionstest er en afgørende analyse i forbindelse med udredning af den sjældne immundefekt Hæmfagocytisk Lymfocytose (HLH).

HLH er en livstruende sygdom, der oftest diagnosticeres hos spædbørn, men som kan forekomme i alle aldersgrupper. I Danmark diagnosticeres HLH i gennemsnit hos færre end 5 personer årligt.

Indledningsvis giver HLH diffuse og almindelige symptomer, hvorfor sygdommen er svær at diagnosticere. Det medfører, at udredningsforløbene hos HLH-patienter kan være lange og komplekse, hvilket naturligvis påvirker de involverede familier meget.

HLH er karakteriseret ved alvorlige forstyrrelser i immunforsvaret, blandt andet en nedsat funktion af patientens NK-celler (se faktaboks 1). Den førnævnte NK-funktionstest kan indikere, om patientens diffuse symptomer skyldes en funktionsnedsættelse af NK-cellerne. Med andre ord om patientens NK-celler er i stand til at degranulere, når de stimuleres, og dermed om patienten har HLH eller ej.

Dalende kvalitet skaber usikkerhed

På Blodbank og Immunologi anvendes et særligt

degranuleringsassay til at estimere, hvor stor en procentdel af patientens NK-celler der degranulerer, når de in vitro stimuleres med en K562-cellelinje (se faktaboks 2). Prøvematerialet til NK-funktionstesten består af oprensede perifere mononukleære blodceller (PBMC) fra en blodprøve.

Kvalitetssikring af testen foregår ved at analysere prøvemateriale fra tre tilfældigt udvalgte bloddonorere sideløbende med patientprøven. Resultaterne (NK-degranuleringsprocenten) fra patientprøven sammenholdes med NK-degranuleringsprocenterne fra bloddonorerne, som antages at have normalt fungerende NK-celler.

De seneste år har medianen for NK-degranuleringsprocenterne opnået på bloddonorprøverne været faldende. Dette har medført udfordringer i forbindelse med tolkning af analysesvarene og bekymringer om testens fortsatte diagnostiske anvendelighed.

Da NK-funktionstesten gennemsnitligt er udført 12 gange årligt de seneste år, kan man få tanken, at det ikke er her, der bør anvendes en masse tid og ressourcer.

Men vi må ikke glemme, at det har en stor betydning for patienterne og deres pårørende, at diagnosticering og monitorering af HLH sker på baggrund af kvalificerede analysesvar. Derfor valgte Blodbank og Immunologi at udbyde netop denne problemstilling til et bachelorprojekt, som blev prioriteret højt.

Fra problemstilling til bachelorprojekt

Vi arbejdede med denne problemstilling i forbindelse med vores bachelorprojekt.

Dette projekt vakte vores interesse, da det omhandlede en lille patientgruppe og "godt gammeldags" manuelt laboratoriearbejde. Gennem vores studietid havde store patientgrupper, den nyeste teknologi og højaktuelle emner domineret. Dette projekt har været en påmindelse om, at patienter med sjældne sygdomme er lige så af-

hængige af, at deres diagnostiske analyser udvikles og kvalitetssikres grundigt.

Inspiration fra børnehospital i London

I forsøget på at optimere den nuværende NK-funktionstest med K562 cellelinjen valgte vi at tage udgangspunkt i andre metoder til NK-funktionstest, som efter sigende fungerer på andre hospitaler. I de alternative metoder anvendes andre stimulatorer til at aktivere NK-degranuleringen. Vores håb var, at netop disse alternative metoder og stimulatorer kunne højne kvaliteten af NK-funktionstesten. Herudover havde vi fokus på de forskellige laboriemæssige fordele og ulemper, der var ved anvendelsen af metoderne.

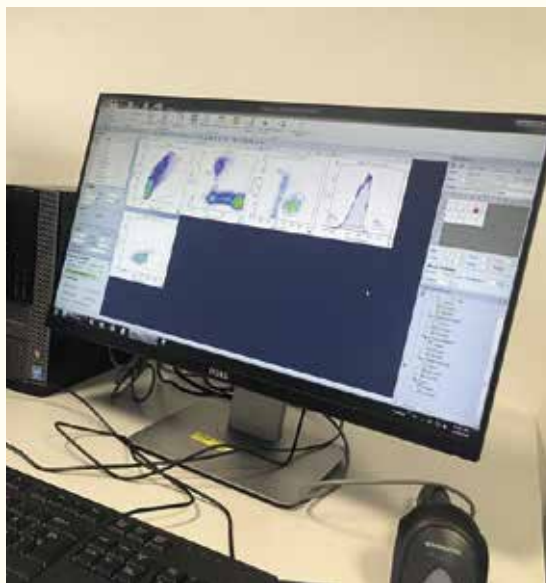
Vi tog udgangspunkt i en metode, som anvendes på Great Ormond Street Hospital for Children i London (1). NK-degranulering blev i denne metode aktiveret af phytohæmagglutinin (PHA) på oprensede perifere mononukleære blodceller (PBMC) (se faktaboks 2). Forud for tilsætningen af PHA skulle PBMC inkubere natten over med interleukin-2 (IL-2). Fordelen ved denne stimuleringsmetode var, at vi herved undgik en optøningsprocedure af K562-cellelinjen. Dog krævede metoden, at PBMC inkuberede med IL-2 natten over, hvilket var en tidsmæssig ulempe.

Vi startede med at afprøve den oprindelige NK-funktionstest fra børnehospitalet i London. Denne afprøvede vi i et parret opsæt, hvor vi sammenlignede NK-degranuleringsprocenterne opnået med de to NK-funktionstest. Herudover afprøvede vi en række forskellige forsøgsopstillinger, eksempelvis PHA-titrering og udskiftning af K562-cellelinjen med PHA og IL-2 i den nuværende NK-funktionstest.

Inspiration fra indisk forskning

Ved struktureret litteratursøgning fandt vi en international forskningsartikel fra et hospital i Mumbai (2). Metoden beskrevet i artiklen fore-

Aflæsning af resultater på flowcytometer NovoCyte 3000.



så skrev, at man kunne stimulere NK-celler til degranulering ved anvendelse af PMA og ionomycin (se faktaboks 2). Herved kunne der opnås høje NK-degranuleringsprocenter på kontrolmateriale. Metoden havde sin fordel, idet den kunne udføres direkte på fuldblod. Herved undgik vi PBMC-oprensningssproceduren. Herudover skulle vi ikke optø K562-cellelinjen, og IL-2-inkuberingen fra førnævnte metode fra London undgik vi også. Yderligere anså vi metoden som en fordel at anvende, da den kunne udføres på et mindre blodvolumen. Dette var særdeles fordelagtigt, da analysen ofte foretages på prøvemateriale fra spædbørn.

Metoden fra hospitalet i Mumbai afprøvede vi også i en række forsøg. Herudover afprøvede vi stimuleringsmetoden på både fuldblod og oprensede PBMC.

Detektionsprincip

Til detektion anvendte vi flowcytometri og fluo-

Natural killer cells (NK-celler):

NK-celler er granulære lymfocytter, der aktiveres som en del af forsvaret mod virus, bakterier og cancerceller. På NK-cellers overflade findes talrige aktiverende receptorer, der aktiverer NK-cellen til at facilitere celledrab ved førnævnte tilstande. NK-celler dræber ved at degranulere og udskille perforin og granzym, som medfører apoptose hos målcellen.

Stimulatorer:

K562-cellelinje:

Denne cellelinje består af leukæmiske celler. Da disse cancerceller ikke udtrykker major histocompatibility complex klasse 1, vil de aktivere degranuleringen af normalt fungerende NK-celler.

Phytohæmagglutinin (PHA) og Interleukin-2 (IL-2):

PHA er et lektin, som aktiverer til NK-degranulering. De eksakte mekanismer, som aktiverer NK-degranuleringen, er ikke beskrevet i litteraturen.

IL-2 anvendes som potent vækstfaktor og har en aktiverende effekt på NK-celler, da deres cytotoxiske potentiale øges.

Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og ionomycin:

PMA aktiverer protein kinase C, mens ionomycin øger den intracellulære mængde af calcium. Kombinationen af disse to stoffer giver signal til NK-cellen, hvorved den degranulerer.

”Vi anså den indiske metode som en fordel at anvende, da den kunne udføres på et mindre blodvolumen. Dette var særdeles fordelagtigt, da analysen ofte foretages på prøvemateriale fra spædbørn”

FAGLIG

rokrommærkede antistoffer. Antistofferne var specifikke for antigenerne på de forskellige cellyper, som var repræsenteret i prøvematerialet (PBMC). Herved kunne vi adskille de forskellige cellyper i scattergrammer.

Da CD107a-antigenet bliver blotlagt ved NK-degranuleringen, kunne vi ved tilsætning af anti-CD107a detektere degranulerede NK-celler. Ved at sammenholde populationen af NK-celler med andelen af CD107a-positive NK-celler kunne vi estimere, hvor stor en procentdel NK-celler der var degranuleret.

Samtlige NK-degranuleringsopsæt og PBMC-oprensninger blev udført ved sterilt og manuelt arbejde i en LAF-bænk. Analyseproceduren var tidskrævende, og de forskellige komplekse opsæt havde mange kritiske trin, så forud for laboratoriarbejde udarbejdede vi egne instrukser til hvert forsøg.

De ønskede resultater udeblev

Til vores store skuffelse erfarede vi, at de alternative NK-funktionstest gav betydeligt lavere NK-degranuleringsprocenter på kontrolmaterialet end ved brugen af K562-cellelinjen.

Vi var meget ærgerlige over vores resultater, da vi havde et stort ønske om at finde en løsning på problemet for afdelingen.

Vores følelse af at stå tilbage med et ubrugeligt resultat blev dog langt fra delt af afdelingens personale. De gjorde os opmærksomme på, at et ”ne-

gativt” resultat også havde stor betydning for dem. Vores arbejde ville have taget lang tid for dem at udføre, hvis de skulle udføre alle de komplekse opsæt sideløbende med deres rutinearbejde.

Gennem vores forsøg fik de afdækket et område i deres søgen efter en optimeringsløsning.

Det næste bedste skridt

Vi ville have prøvet at udføre NK-funktionstesten med en K562-cellelinje fra et laboratorium med et velfungerende assay eller med en ny K562-cellelinje fra producenten. Vi fandt ud af, at cellelinjen er vanskelig at skaffe hjem.

Her kunne vi endnu en gang stille os selv det etiske spørgsmål: Er det værd at bruge ressourcerne på en cellelinje til en analyse, der gennemsnitligt udføres 12 gange årligt? Det var vi ikke længere i tvivl om, grundet analysens vigtighed for de få berørte patienter. Derfor anbefalede vi afdelingen at anskaffe en ny cellelinje og undersøge, om denne kunne resultere i højere NK-degranuleringsprocenter end den nuværende.

Vi er senere blevet informeret om, at en ny K562-cellelinje er blevet anskaffet. Grundet travlhed i laboratoriet i forbindelse med Covid-19 har det ikke været muligt at få afprøvet denne nyan-skaffede K562-cellelinje. Forhåbentlig vil den vise sig at være den optimeringsløsning, som vi ikke lykkedes med at finde. ■

Referencer:

¹ Wheeler, R.D., Cale, C.M., Cetica, V., Aricò, M., Gilmour, K.C. Correspondence: A novel assay for investigation of suspected familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 2010; 150(6): 727-30.

² Shabrish, S., Gupta, M., Madkaikar, M. A Modified NK Cell Degranulation Assay Applicable for Routine Evaluation of NK Cell Function. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 3769590.

Katrine Rafn Josiasen, Marie Nørkjær Larsen og Mette Bruun modtog i februar 2020 dbio's bachelorpris, 2.-prisen for deres projekt ”Metodeoptimering af NK-funktionstest til udredning”.

Vejledere: Bioanalytikerunderviser Ketty Bruun, Blodbank og Immunologi, Aarhus Universitetshospital, og Jonas Thorsen, VIA

Læs bachelorprojektet på: dbio.dk/uddannelse-og-karriere/bachelorpris/Sider/side.aspx