

Ogólnopolski Bank Tkanek Chorych na Genodermatozy Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym

Koleżanki i Koledzy,

wzorem działających w innych krajach banków tkanek i materiału genetycznego uchwałą Prezydium Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w grudniu w 2011 roku powołano Ogólnopolski Bank Tkanek Chorych na Genodermatozy Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego z siedzibą w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Poniżej przedstawione zostaną założenia i zasady tworzenia banku oraz procedury obowiązujące przy gromadzeniu materiału i danych klinicznych o pacjentach z chorobami o podłożu genetycznym.

1. Koncepcja, cele i uzasadnienie potrzeby tworzenia banku tkanek i materiału genetycznego od osób z genodermatozami

Odczytanie, na koniec ubiegłego wieku, sekwencji ludzkiego genomu stało się punktem zwrotnym w badaniach nad poznaniem struktury i funkcji materiału genetycznego człowieka. Badania te przyczyniły się do zweryfikowania liczby genów w genomie człowieka, których mamy około 25 000, a nie jak dotychczas sądzono 30 000–50 000. Jednak funkcja genomu i jego części ciągle pozostaje niezbadaną tajemnicą. Szacuje się, że geny kodujące białka stanowią tylko około 5% ludzkiego genomu. Ciągle jeszcze niewiele wiadomo o funkcji pozostałej jego części.

W rozwiązaniu tych tajemnic może pomóc dokonujący się współcześnie postęp w dziedzinie metod molekularnych, takich jak genomowe mikromacie-rze (technika *comparative genomic hybridisation* – *array-CGH*), pozwalających na jednoczesną analizę wielu znanych polimorfizmów genetycznych, np. zamiany pojedynczych nukleotydów (SNP), analizę zmienności liczby kopii genów (ang. *copy number variation* – CNV), techniki badania ekspresji genów na poziomie transkrypcji (*real-time* PCR), techniki badające asocjacje choroby ze znanymi polimorfizmami (badanie pojedynczych substytucji nukleotydowych, ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP, oraz jednoczesne badanie wielu znanych SNP, technika *genome wide association studies* – GWAS), a także opracowane współcześnie metody badania mechanizmów epigenetycznych, regulujących ekspresję genów w komórkach (analiza profilu metylacji promotorów, otwartych transkrypcyjnie miejsc chromaty-ny – FAIRE). Rozwój tych metod badania genomu człowieka pozwala na poznanie podłoża zmienności populacji ludzkich, na poznanie roli zjawisk epigenetycznych i czynników środowiskowych (diety) w regulacji funkcji genów. Uzyskane do tej pory wyniki badań z zastosowaniem tych metod przyczyniły się do poznania molekularnego podłoża wielu chorób oraz do stworzenia nowych dziedzin nauki, takich jak proteomika – wiedza o funkcji i wzajemnej zależności białek, metabolomika – nauka o roli białek w regulacji metabolizmu komórkowego, do poznania roli mikrosatelitarnego RNA (mi-RNA) w regulacji funkcji genów i patogenezie chorób oraz występującej w genomie człowieka zmienności liczby kopii genów i zjawisk wzajemnego oddziaływania mutacji lub polimorfizmów genów (epistaza lub hipostaza). Badania te przyczyniają się do opracowania nowych metod leczenia chorób człowieka, takich jak zastosowanie leków biologicznych (anty-TNF, anty-IL-23), przeciwciał blokujących funkcję wybranych genów, ważnych dla patologii choroby czy interferencyjnego RNA (si-RNA), wyłączonego ekspresję wybranych genów lub całych ich grup.

Rozwój nowych metod badawczych stwarza zupełnie nowe możliwości poznania molekularnego podłoża genetycznych chorób skóry, jednak postęp tych prac w Polsce jest ciągle niewystarczający. Do zasadniczych ograniczeń postępu w poznaniu molekularnego podłoża rzadkich genetycznych chorób skóry (genodermatoz) należą wysokie koszty badania genetycznego pojedynczego przypadku choroby, często niewspółmierne do spodziewanego efektu, jakim jest publikacja, oraz brak specjalistycznych ośrodków posiadających odpowiednie zaplecze badawcze i naukowe.

Spowodowane jest to faktem, że analiza molekularnych przyczyn choroby, poszukiwanie mutacji w genie wymaga często zastosowania metody sekwencjonowania całego genomu, co nie jest możliwe bez współpracy ze specjalistycznymi, wyposażonymi w odpowiedni sprzęt i aparaturę laboratoria-mi, jest procesem kosztownym i czasochłonnym. Podnosi to znacznie koszt badań i bez środków zewnętrznych pochodzących z grantów badawczych często uniemożliwia analizę i wyjaśnienie molekularnych przyczyn choroby.

Spowodowane jest to faktem, że analiza molekularnych przyczyn choroby, poszukiwanie mutacji w genie wymaga często zastosowania metody sekwencjonowania całego genomu, co nie jest możliwe bez współpracy ze specjalistycznymi, wyposażonymi w odpowiedni sprzęt i aparaturę laboratoria-mi, jest procesem kosztownym i czasochłonnym. Podnosi to znacznie koszt badań i bez środków zewnętrznych pochodzących z grantów badawczych często uniemożliwia analizę i wyjaśnienie molekularnych przyczyn choroby.

larnej przyczyny pojedynczych przypadków rzadkich chorób. Dlatego często opisuje się je jako kazuistykę bez podania przyczyn genetycznych choroby, a zgromadzony materiał i przypadki leczone w klinice nierzadko są dla genetyka bezpowrotnie traczone. Podobnie jest w dziedzinie genetycznych analiz wieloczynnikowych chorób skóry, takich jak atopowe zapalenie skóry czy łuszczyca. Aby wyniki tych prac mogły być publikowane w renomowanych czasopismach, wymagają weryfikacji w dużej grupie badanych osób oraz odpowiedniego doboru grupy kontrolnej z uwzględnieniem struktury wiekowej oraz pochodzenia etnicznego. Publikowane prace analizujące częstość występowania wybranych polimorfizmów lub mutacji w populacji polskiej oparte są na małej liczbie badanych przypadków i często wnioski nie jest wiarygodne. Z tego powodu w większości krajów europejskich powoływane są wieloosrodkowe konsorcja do przeprowadzania szeroko zakrojonych badań populacyjnych takich chorób, jak łuszczyca, choroby naczyniowe czy choroby rzadkie (*orphan diseases*), oraz tworzone są banki tkanek w celu gromadzenia materiału badawczego do przeprowadzania badań.

Zasadniczym celem banku jest gromadzenie materiału biologicznego oraz danych klinicznych od osób chorych na genodermatozy w populacji Polski oraz od osób zdrowych.

Ogólnopolski Bank Tkanek Chorych na Genodermatozy, zwany dalej Bankiem, służy jako zabezpieczenie materiału badawczego zbieranego w poszczególnych ośrodkach regionalnych (klinikach), biorących udział w projekcie oraz jako miejsce gromadzenia materiału biologicznego i informacji klinicznych o chorych na genodermatozy z Polski. Ośrodki gromadzące materiał badawczy (kliniki) są właścicielami gromadzonego materiału i informacji klinicznych (udziałowcami Banku) i mają możliwość jego wykorzystania do badań genetycznych. W uzasadnionych projektach badawczych dostęp do całości gromadzonego materiału z danej grupy chorób ma wybrana przez udziałowców Rada Programowa Banku, która wydaje zgodę na realizację projektów z wykorzystaniem materiału gromadzonego w Banku.

2. Zespoły chorobowe, których będzie dotyczył materiał gromadzony w Banku

Listę chorób, których będzie dotyczył materiał gromadzony w Banku, oraz szczegółowe ankiety zawierające dane kliniczne, laboratoryjne i genetyczne zbierane w Banku przygotowują powołane zespoły badawcze w ramach projektu grantu na powstanie Banku.

Proponujemy gromadzenie w Banku materiału dotyczącego wymienionych chorób.

CHOROBY JEDNOGENOWE

1. Pęcherzowe oddzielanie się naskórka:
 - a) postać zwykła,
 - b) postać łącząca,
 - c) postać dystroficzna,
 - d) zespół Kindlera.
2. Genetycznie uwarunkowane schorzenia elastyny i kolagenu:
 - a) zespół Ehlersa-Danlosa,
 - b) zespół sztywnej skóry,
 - c) skóra wiotka,
 - d) zespół Aschera,
 - e) kępki żółte rzekome.
3. Nerwiakowłókniakowatość.
4. Stwardnienie guzowate.
5. Choroby wynikające z zaburzenia naprawy DNA i niestabilności chromosomalnej:
 - a) skóra pigmentowata i barwnikowa,
 - b) zespół Cockayne'a,
 - c) trichotiodystrofia,
 - d) zespół ataksja–teleangiektazja.
6. Zespoły przedwczesnego starzenia:
 - a) zespół Wernera,
 - b) zespół Blooma,
 - c) progeria Hutchinsona-Gilforda (progeria młodzieńcza),
 - d) akrogeria.
7. Poikilodermie wrodzone:
 - a) zespół Rothmunda-Thompsona,
 - b) wrodzona dyskeratoza,
 - c) anemia Fanconiego,
 - d) wrodzona poikilodermia z rogowaceniem,
 - e) wrodzona poikilodermia ze stwardnieniem skóry,
 - f) poikilodermia z towarzyszącą neutropenią.
8. Zaburzenia keratynizacji:
 - a) grupa rybiej łuski,
 - b) rogowce dłoni i podeszew,
 - c) erytrokeratodermie,
 - d) rogowacenie mieszkowe,
 - e) choroby z dyskeratozą i akantolizą:
 - choroba Dariera,
 - choroba Grovera,
 - choroba Haileya-Haileya,
 - f) porokeratozy uwarunkowane genetycznie.
9. Zespoły dysplazji ektodermalnych:
 - a) zespół Christa-Siemensa-Touraine'a,
 - b) zespół Cloustonea,
 - c) zespół zęba i paznokcia,
 - d) inne.
10. Mozaicyzm:
 - a) nietrzymanie barwnika,
 - b) ogniskowy niedorozwój skóry,
 - c) zespół MIDAS,
 - d) mozaicyzm barwnikowy typu Ito,
 - e) hipomelanoza liściasta,

- f) zespół McCune'a-Albrighta,
 g) zespół Dellemana,
 h) lipomatoza mózgowo-czaszkowo-skórna,
 i) znamiona naskórkowe,
 j) zespoły znamion naskórkowych:
 - zespół Proteus,
 - zespół CHILD,
 - inne,
 k) inne.
11. Zaburzenia rozwojowe naczyń:
 a) zespół rodzinnej malformacji żyłnej,
 b) dziedziczne krwotoczne teleangiektazje,
 c) zespół Struge'a-Webera,
 d) zespół Klippel-Trenaunaya,
 e) inne.
12. Dermatyzmy związane z dziedzicznymi niedoborami odporności:
 a) zespół Omenna,
 b) zespół Wiskotta-Aldricha,
 c) zespół nadmiaru IgE,
 d) przewlekła choroba ziarniniakowa,
 e) zespoły ostrej gorączki.
13. Zaburzenia barwnikowe uwarunkowane genetycznie:
 a) choroba Dowlinga-Degosa,
 b) zespół Naegelięgo,
 c) uogólniona wrodzona melanoza,
 d) choroby z grupy albinizmu,
 e) piebaldyzm,
 f) zespół Waardenburga,
 g) inne.
14. Porfirie:
 a) porfiria skórna późna,
 b) inne.
15. Zaburzenia struktury lub ilości włosów uwarunkowane genetycznie (w wykazie pominięto zmiany towarzyszące zespołom chorobowym wymienionym w innych podpunktach):
 a) włosy paciorkowate (*monilethrix*),
 b) włosy obrączkowe,
 c) włosy wełniste,
 d) zespół włosów niedających się uczesać,
 e) wrodzone zespoły przebiegające z nadmiernym owłosieniem,
 f) wrodzone zespoły przebiegające z brakiem owłosienia,
 g) wrodzone zespoły przebiegające ze zmniejszoną liczbą mieszków włosowych,
 h) inne.
16. Zaburzenia struktury paznokci uwarunkowane genetycznie:
 a) zespół żółtych paznokci,
 b) *pachyonychia congenita*,
 c) zespół paznokieć-rzepka,
 d) inne.
17. Choroby tkanki tłuszczowej uwarunkowane genetycznie:
 a) wrodzone lipodystrofie częściowe i uogólnione,
 b) zapalenie tkanki podskórnej z niedoboru α -antytrypsyny.
18. Nowotwory niezłośliwe:
 a) torbiele:
 - mnogie kaszaki,
 - torbiel trichilemmalna,
 - torbiele wysiewne włosów męzkowych,
 b) pochodzenia naskórkowego:
 - rogowacenie łojotokowe,
 - rodzinna postać rogowacenia ciemnego,
 c) mieszka włosowego:
 - *trichoepitelioma*,
 - *pilomatricoma*,
 d) gruczołów potowych:
 - obłak,
 - gruczolak potowy wysiewny,
 e) mezenchymalne:
 - mięśniakowatość dziecięca,
 f) mięśni gładkich.
19. Nowotwory złośliwe:
 a) zespół znamionowych raków podstawnokomórkowych (zespół Gorlina),
 b) inne zespoły związane z mnogimi rakami podstawnokomórkowymi,
 c) zespół Muira-Torre'a,
 d) mnogie samoistnie gojące się raki kolczystokomórkowe.
20. Inne:
 a) wrodzony obrzęk naczynioruchowy,
 b) niedorozwój wrodzony skóry,
 c) zespół Beare'a-Stevensona,
 d) *pachydermoperiostosis*,
 e) zespół Buschkego-Ollendorffa,
 f) postać pierwotna erytromelalgii,
 g) rodzinny rumień dłoni i stóp,
 h) dziedziczna dysplazja nabłonka błon śluzowych,
 i) rodzinny rumień obrączkowy,
 j) lipoproteinoza,
 k) włókniakowatość hialinowa dziecięca,
 l) *acrodermatitis enteropathica*,
 ł) inne rzadkie zespoły uwarunkowane genetycznie.

CHOROBY WIELOCZYNNIKOWE

1. Atopowe zapalenie skóry.
2. Łuszczyca.
3. Autoimmunizacyjne choroby pęcherzowe:
 - a) grupa pęcherzycy,
 - b) grupa pemfigoidu,
 - c) opryszczkowe zapalenie skóry (z grupą kontrolną – choroba trzewna).

4. Autoimmunizacyjne choroby tkanki łącznej:
 - a) *morphea* (twardzina ograniczona),
 - b) twardzina układowa,
 - c) toczeń rumieniowaty skórny (CLE):
 - postać przewlekła (DLE),
 - postać podostra (SCLE),
 - d) toczeń rumieniowaty układowy (SLE),
 - e) toczeń indukowany lekami (DILE),
 - f) zapalenie skórno-mięśniowe,
 - g) mieszana choroba tkanki łącznej.
 5. ANCA – dodatnie zapalenia małych naczyń:
 - a) ziarniniak Wegenera,
 - b) zapalenie małych naczyń,
 - c) zespół Churga-Strauss.
 6. Pierwotny zespół antyfosfolipidowy.
 7. Choroba Behçeta.
 8. Nawrotowe zapalenie wielochrzęstkowe.
 9. Bielactwo nabyte.
 10. Łysienie plackowate.
 11. Łysienie androgenowe.
 12. Sarkoidoza.
 13. Mucynozy:
 - a) liszaj śluzowaty,
 - b) liszaj śluzowaty twardzinowy,
 - c) obrzęk twardzinowy,
 - d) siatkowata mucynoza mieszkowa,
 - e) ogniskowa skóra mucynoza.
 14. Nowotwory:
 - a) rak podstawnokomórkowy,
 - b) rak kolczystokomórkowy,
 - c) rogowiak kolczystokomórkowy,
 - d) choroba Pageta,
 - e) czerniak,
 - f) guzowaty włókniakomięsak skórny,
 - g) mięsak z mięśni gładkich,
 - h) rak z komórek Merkla,
 - i) mięsak Kaposiego,
 - j) inne.
 15. Chłoniaki skóry:
 - a) ziarniniak grzybiasty,
 - b) zespół Sezary'ego,
 - c) *lymphomatoid papulosis*,
 - d) inne.
 16. Mastocytozy.
 17. Histiocytozy.
 18. Osutki polekowe:
 - a) toksyczna nekroliza naskórka,
 - b) DRESS,
 - c) AGEP.
 19. Liszaj twardzinowy.
 20. Przewlekłe wrzodziejące zapalenie jamy ustnej.
 21. *Erythema dyschromicum perstans*.
 22. Przykurcz Dupuytrena.
 23. Keloidy.
 24. Łupież czerwony mieszkowy.
 25. Liszaj płaski i choroby spokrewnione, takie jak liszaj lśniący czy liszaj pasmowaty.
 26. Podrogowa dermatoza krostkowa.
 27. Ziarniniak obrączkowaty.
 28. Kępkki żółte.
 29. *Erythema gyratum repens*.
- 3. Zasady dotyczące zgody komisji bioetycznych i zgody pacjentów na wykorzystanie materiału do badań genetycznych**
- Gromadzony w Banku materiał badawczy wymaga uzyskania zgody komisji bioetycznej na prowadzone badania oraz zgody osób chorych i zdrowych na anonimowe wykorzystanie pobranego od nich materiału oraz gromadzonych danych klinicznych do wszystkich badań mogących wyjaśnić podłoże molekularne choroby.
- Proponujemy, aby w każdym wniosku do komisji bioetycznej w formularzu świadomej zgody pacjenta lub osoby zdrowej dodawać sformułowanie:
- Wyrażam zgodę na gromadzenie pobranego ode mnie materiału w Ogólnopolskim Banku Tkanek Chorych na Genodermatozy w Gdańsku oraz na anonimowe wykorzystanie zebranych ode mnie i mojej rodziny danych klinicznych do wszystkich badań mogących wyjaśnić podłoże molekularne choroby.*
- 4. Procedury dotyczące rodzaju oraz sposobu pobierania, przechowywania i transportu tkanek**
- Rodzaj pobieranego materiału oraz sposób jego konserwacji i przechowywania zależy od badanej choroby. Opracowane zostaną procedury dla poszczególnych grup chorób, w zależności od przewidywanych do zastosowania metod badawczych.
- Ogólnie powinno się przyjąć zasadę, że należy gromadzić w Banku tkanki, które umożliwiają zastosowanie:
- metod molekularnych opartych na analizie DNA, RNA i białek,
 - metod immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych,
 - metod opartych na testach immunoenzymatycznych (ELISA, ELISPOT),
 - metod hodowli komórkowych *in vitro*.
- W przypadku rzadkich genodermatoz występujących rodzinie należałoby gromadzić materiał od wszystkich członków najbliższej rodziny.
- Podobnie w badaniach populacyjnych często występujących genodermatoz należałoby przewidzieć gromadzenie materiału od najbliższej rodziny osoby chorej.
- Rodzaj pobieranego materiału**
- Od każdej osoby należy pobierać i przechowywać w Banku:
- a) krew na EDTA w celu izolacji DNA;

- b) krew na RNA (zabezpieczona przed degradacją RNA – Fenzol A&A Biotechnology):
 - wycinki tkankowe (skóra zmieniona i niezmienniona chorobowo, komórki śluzówki jamy ustnej – wymaz) – zamrożone w azocie i potem przechowywane w temperaturze -80°C ;
- c) próbki moczu na analizy DNA – zamrożone w temperaturze -80°C ;
- d) surowicę – krew pobrana na skrzep i zamrożona w temperaturze -80°C ;
- e) tkankę lub komórki zawieszona w DMSO, zamrożona w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C – w celu wyprowadzania linii komórkowych *in vitro*.

5. Procedury zbierania, przesyłania, przechowywania i dostępu do informacji o przechowywanych tkankach

Ogólnopolski Bank Tkanek Chorych na Genodermatozy służy jako zabezpieczenie materiału badawczego zbieranego w poszczególnych ośrodkach regionalnych biorących udział w projekcie oraz jako miejsce gromadzenia materiału biologicznego i informacji klinicznych o chorych na genodermatozy z populacji Polski. Regionalne ośrodki biorące udział w tworzeniu Banku zbierają materiał badawczy w swoich jednostkach, a po zebraniu przesyłają go do Banku. Materiał (krew, tkanki, surowica, mocz) powinien być transportowany w warunkach zabezpieczających go przed degradacją.

Ośrodki zbierające materiał badawczy są właścicielami gromadzonego w ośrodku akademickim (szpitalu, klinice) materiału i informacji klinicznych. Dostęp do całości materiału gromadzonego w Banku ma wybrana przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego Rada Programowa Banku, która wydaje zgodę na realizację projektów badawczych z wykorzystaniem tego materiału. Zasady wyboru Rady Programowej Banku zostaną określone w późniejszej uchwale Prezydium PTD.

6. Zasady przechowywania oraz kontroli jakości materiału przechowywanego w Banku

Za jakość przechowywanego materiału oraz izolowanego materiału genetycznego (DNA, RNA) odpowiadają osoby zatrudnione w Ogólnopolskim Banku Tkanek Chorych na Genodermatozy.

7. Zasady finansowania Banku, w tym:

- a) tworzenia Banku,
- b) działania Banku,
- c) przechowywania materiału,
- d) zbierania, wprowadzania i przechowywania informacji o chorych.

Zamierzamy wystąpić do Narodowego Centrum Nauki o przyznanie grantu aparaturowego na utworzenie Ogólnopolskiego Banku Tkanek Chorych na Genodermatozy. Projekt będzie uwzględniał zakup zamrażarek niskotemperaturowych dla ośrodków regionalnych tworzących Bank (klinik uniwersyteckich), dla potrzeb Banku oraz sprzętu niezbędnego do transportu, izolacji, gromadzenia i przechowywania materiału genetycznego.

Opracowali

Bogusław Nedoszytko
Katedra i Klinika Dermatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
Centralny Bank Tkanek
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Cezary Kowalewski
Katedra i Klinika Dermatologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Aleksandra Dańczak-Pazdrowska
Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Jarosław Skokowski
Wojewódzkie Centrum Onkologii,
Centralny Bank Tkanek
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Jadwiga Roszkiewicz
Katedra i Klinika Dermatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Jacek Szepietowski
Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu,
Przewodniczący Polskiego
Towarzystwa Dermatologicznego

Roman Nowicki
Katedra i Klinika Dermatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego