

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ МЕТОДОМ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕЛЕКЦИИ И ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ДНК.

Е.И.Желнова, И.А.Демидова, И.В.Гальцева, Л.С.Любимова, А.В.Мисюрин, В.Г. Савченко
Гематологический Научный Центр Российской Академии Медицинских Наук, Москва, 125167

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование гемопоэтического химеризма в клеточных популяциях периферической крови и цельной популяции клеток костного мозга у больных гемобластозами, перенесших аллогенную трансплантацию стволовых клеток крови (ТГСК) (n=31). Выполнялась ПЦР - амплификация гипервариабельных регионов ДНК, содержащих тандемные повторы (hypervariable number of tandem repeats - VNTR и short number of tandem repeats - STR). Клеточные популяции (гранулоциты и популяции лимфоцитов – Т- и В-лимфоциты) выделялись методом иммуномагнитной селекции. В 17 случаях был выявлен полный донорский химеризм во всех исследованных образцах. У 14 пациентов был выявлен смешанный химеризм хотя бы в одной клеточной популяции. Персистенция хозяйских клеток чаще выявлялась при исследовании клеточных популяций, чем при изучении клеток костного мозга. Была обнаружена зависимость возникновения рецидива заболевания от существования смешанного химеризма в лимфоидных популяциях клеток периферической крови (p=0,03). Выявление полного донорского химеризма в популяции Т-лимфоцитов коррелировало с возникновением реакции «трансплантат против хозяина» (p=0,03). Исследование гемопоэтического химеризма в разделенных клеточных популяциях периферической крови реципиентов ТСКК является эффективным методом изучения функции трансплантата и определения риска развития рецидива заболевания или аллоиммунных осложнений.

Ключевые слова: гемопоэтический химеризм, амплификация гипервариабельных участков ДНК, иммуномагнитная селекция, аллогенная трансплантация стволовых клеток крови.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF HEMATOPOIETIC CHIMERISM IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS USING IMMUNOMAGNETIC SELECTION AND PCR-AMPLIFICATION OF HYPERVARIABLE REGIONS OF DNA

E.I.Zhelnova, I.A.Demidova, I.V.Galtzeva, L.S.Liubimova, A.V.Misiurin, V.G.Savchenko

(Research Center for Hematology of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125167)

ABSTRACT

We investigated hematopoietic chimerism in cell subsets of peripheral blood and unmanipulated population of bone marrow cells in patients with hematologic malignancies underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (n=31). We performed PCR amplification of DNA regions with hypervariable number of tandem repeats - VNTR and short number of tandem repeats – STR. Cell populations (granulocytes and lymphocytes – T- and B-cells) were extracted using immunomagnetic selection. In 17 cases we find out complete donor chimerism in all samples. In 14 pts we documented mixed chimerism in different cell subsets. Persistence of host cells was evaluated in cell subsets more often then in bone marrow. We find out the correlation between relapse and mixed chimerism in lymphocytes of peripheral blood ($p=0,03$). Complete donor chimerism in T-cells correlated with development of graft-versus host reaction ($p=0,03$). Investigation of hematopoietic chimerism in cell subsets of peripheral blood of ps after hematopoietic stem cell transplantation is effective method for studying of transplant function and risks for developing of relapse or alloimmune complications.

Key words: hematopoietic chimerism, amplification of hypervariable regions of DNA, immunomagnetic selection, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Аллогенная трансплантация стволовых клеток крови (ТСКК) в настоящее время является общепризнанным методом терапии опухолевых заболеваний крови. В результате миелоаблативного воздействия режимов кондиционирования и аллоиммунного действия иммунокомпетентных клеток трансплантата происходит замена хозяйского кроветворения на донорское – возникает гемопоэтический химеризм. Полный донорский химеризм – 100% принадлежность гемопоэтических клеток донору - говорит о полном приживлении трансплантата. Выявление клеток хозяйского типа может указывать на отторжение трансплантата или возникновение рецидива заболевания. Поэтому постоянный контроль принадлежности гемопоэтических клеток у реципиентов аллогенной ТСКК необходим как в ранние, так и в отдаленные сроки после трансплантации [1].

Амплификация в ПЦР гипервариабельных регионов ДНК (VNTR и STR) является распространенным методом идентификации принадлежности клеток определенному индивидууму [2,3,4]. Этот метод сочетает в себе высокую чувствительность и информативность благодаря аллельным различиям в числе tandemных повторов в микросателлитах. Высокая степень полиморфизма этих участков ДНК позволяет обнаружить различия между клетками донора и реципиента, обычно являющихся сибсами [5]

Материалом для получения ДНК являются миелокарициты костного мозга или ядродержащие клетки периферической крови донора и реципиента до ТСКК, и реципиента в разные сроки после трансплантации. Они представляют собой клеточные популяции, принадлежащие к разным росткам кроветворения: эритроидному (для костного мозга), миелоидному и лимфоидному. В свою очередь, два последних ростка также состоят из нескольких клеточных популяций, различающихся по функциям и идентифицирующихся по кластерам дифференцировки. Использование ДНК, выделенной из смешанной клеточной популяции, снижает чувствительность метода и не позволяет отслеживать особенности приживления различных ростков кроветворения у реципиентов ТСКК, что может быть важным для изучения функции трансплантата и возникновения рецидива заболевания или аллоиммунных осложнений (реакции «трансплантат против хозяина» - РТПХ) [6,7].

Цель настоящей работы – определение эффективности метода ПЦР-амплификации гипервариабельных участков ДНК различных клеточных популяций периферической крови реципиентов ТСКК после иммуномагнитной селекции для контроля динамики приживления трансплантата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе приводятся результаты обследования 31 больного, которым была выполнена трансплантация аллогенного костного мозга в отделении высокодозной химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга ГНЦ РАМН. Первичное обследование с целью определения информативной метки прошло 62 человека - 31 донор и 31 реципиент. Далее обследовались только реципиенты костного мозга, пережившие более 30 дней после трансплантации. Среди них было 14 мужчин и 17 женщин. Медиана возраста составила 30 лет (18 - 55). 12 пациентов страдали различными вариантами острых лейкозов, 11 - хроническим миелолейкозом, 7 пациентов – миелодиспластическим синдромом, 1- альвеолярной рабдомиосаркомой.

Контрольными сроками для исследования клеточного происхождения кроветворения были +30, +60, +90 дни после ТСКК и далее каждые 3 месяца в течение первого года наблюдения. У каждого пациента забирались образцы костного мозга и периферической крови. Исследовались следующие клеточные популяции: Т-лимфоциты (несущие маркер CD3), В-лимфоциты (несущие CD19), гранулоциты и остаточная клеточная популяция после отделения гранулоцитов, Т- и В-лимфоцитов. Также в исследовании использовался костный мозг без разделения на клеточные популяции.

Выделение клеточных популяций.

ДНК выделялась отдельно из гранулоцитов и мононуклеаров периферической крови после разделения центрифугированием в градиенте плотности фиколла.

Для выделения популяции Т-лимфоцитов, несущих CD3, и популяции В-лимфоцитов, несущих CD19 использовались методики позитивного непрямого и прямого выделения на магнитных микрочастицах, соответственно инструкции, предложенной фирмой Dynal. Остаточная популяция клеток (после отделения CD19 и CD3-позитивных лимфоцитов) также бралась для исследования. Чистота выделения популяций проверялась на всех этапах выделения: после отделения В-лимфоцитов, после культивирования выделенных Т-лимфоцитов в среде и удаления магнитных частиц, а также проверялась остаточная популяция клеток на наличие CD19 и CD3 лимфоцитов.

В редких случаях выделение CD3-позитивных Т лимфоцитов и CD19-позитивных В-лимфоцитов проводилось на свежих образцах. Методика отработывалась на здоровых донорах. Различий при выделении клеточных популяций из крови больных и здоровых людей не получено, также не было получено различий при разделении замороженных и свежих образцов.

Исследуемые генетические маркеры

Для исследования приживления костного мозга у больных после трансплантации были выбрано 10 гипервариабельных участков ДНК, а также гены, используемые для идентификации пола.

Исследовались 4 гипервариабельных локуса VNTR: APO-B - в 3 фланкирующем регионе гена аполипопротеина В на 2 хромосоме (2p23-p24), pYNZ 22 - VNTR D17 S30 на 17 хромосоме в локусе 17p13, pMCT 118, находящийся в локусе D1S80 на 1 хромосоме, p33.6, расположенный в локусе D1S11 на коротком плече той же хромосомы, а также гены, локализованные на 1 хромосоме – zona pellucida gene (ZP3) и Y хромосоме – testis determination gene (SRY), используемые при идентификации половой принадлежности исследуемых клеток (при разнополых трансплантациях) [8]. При отсутствии информативной метки по вышеуказанным VNTR исследовались 6 локусов, содержащих STR [9].

Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК использовались ранее изолированные субпопуляции лейкоцитов периферической крови и миелокариоциты костного мозга реципиентов и доноров костного мозга. Контроль концентрации ДНК проводился спектрофотометрически.

Условия проведения ПЦР

Объем реакционной смеси составлял 25 - 50 микролитров. В реакционную смесь вносилось 2-2,5 ЕД термостабильной полимеразы Taq и 0,4-0,8 мкг исследуемой ДНК. Амплификация проводилась с помощью автоматических термоциклеров “Hybaid Sprint” (Hybaid, Великобритания) и Терцик (ДНК-Технологии, Россия). В качестве контролей при каждой амплификации использовались: первичный материал донора, первичный материал реципиента, пустой контроль, не содержащий матрицы (для исключения ложноположительных результатов). Чувствительность метода определялась с помощью разведений от 100 до 1% исследуемой ДНК (например, реципиента) в другой ДНК (например, донора) и составила от 4%-2% для VNTR и STR до 1% для ZP3 и SRY. Данные представлены на рис 1 на примере комбинированной амплификации ZP3 и SRY.

Анализ продуктов ПЦР

Анализ полученных после проведения ПЦР фрагментов осуществлялся методом электрофореза в полиакриламидном геле 6-9% концентрации и просвечивания в ультрафиолетовом свете после прокрашивания бромистым этидием. Гели фотографировались при помощи цифрового фотоаппарата Olympus С 3040 Zoom в проходящем ультрафиолете, далее визуализировались на PC Pentium 4 с помощью программы DigiDoc-It (BioRad, США).

Оценка полученных данных

Полученные фотографические изображения обрабатывались с помощью аналитической полуколичественной программы Doc-It (BioRad).

При оценке результатов исследования мы пользовались следующими понятиями, принятыми Международным регистром трансплантации костного мозга (IBMTR) [12]:

Полный химеризм – обнаружение 100% ДНК донора

Смешанный химеризм – обнаружение двух типов ДНК – хозяина и реципиента в определенной клеточной популяции: от 5% до 95% ДНК донора

Расщепленный химеризм – одна или несколько клеточных линий полностью хозяйские, другие (одна или несколько) полностью донорские.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью используемых генетических маркеров информативная метка была обнаружена для всех пар донор/реципиент. По степени информативности распределение было следующим: pYNZ 22 > ZP3/SRY > pMCT 118 > ApoB > p33.6. Степень информативности по каждой из систем представлена в таблице 1. Обнаруживается некоторое различие между ранее опубликованными данными и результатами нашего исследования [8,13]. Возможно, данные различия обусловлены разным расовым и этническим составом обследованных групп.

Поиск информативного локуса является ключевым моментом для анализа гемопозитического химеризма после ТСКК. Идеальным вариантом считается выявление маркера, несущего аллели, специфические как для донора, так и для реципиента. В этом

случае возможно достаточно точно определять в исследуемом образце присутствие ДНК донора и реципиента как качественно, так и количественно. Менее удачным считается обнаружение локуса, несущего одну аллель, общую для донора и реципиента, и другую, специфичную только для реципиента. В этом случае невозможно точно определить степень донорского химеризма, однако возможно выявление ДНК хозяйского типа на ранних этапах, что позволяет предположить отторжение трансплантата или рецидив заболевания. Третьим вариантом является идентификация локуса, имеющего аллель, специфичную для донора и общую аллель для донора и реципиента. В этом случае возможно судить о полном или частичном приживлении донорских стволовых клеток крови, однако невозможно выявить собственную ДНК хозяина [14]. В нашей работе для оценки степени химеризма использовались только локусы, несущие индивидуальные аллели, характерные для донора и реципиента, или локусы, имеющие аллели, характерные для реципиента.

Использование генов, позволяющих провести половую идентификацию (ZP3/SRY), являлось методом выбора в случаях разнополой трансплантации (донор – женщина, реципиент – мужчина). В этих условиях ген SRY, лоцирующийся на Y-хромосоме, являлся маркером собственной ДНК реципиента.

Чувствительность используемой методики оценивалась путем пробной амплификации заранее приготовленной смеси донорской и хозяйской ДНК в различных соотношениях.

Пределом разрешения для разных ПЦР-систем было присутствие от 4% (для ApoB) до 1% (для ZP3/SRY) ДНК реципиента в смеси. Указанные различия в чувствительности могут быть связаны с неполной амплификацией последовательностей в локусах VNTR. Причины неполной амплификации не совсем ясны и могут зависеть от разного GC-соотношения в амплифицируемых фрагментах, и, соответственно, разной температуре отжига [14]. Видимо, использование фиксированной температуры в программе ПЦР не всегда является оптимальной.

Образцы костного мозга и периферической крови брались для исследования в течение первого года после ТСКК. В среднем было исследовано 28 образцов от каждого больного (от 6 до 31). Во всех случаях было успешно проведено разделение образцов периферической крови на фракции гранулоцитов и мононуклеаров. Мононуклеарная фракция, в свою очередь, разделялась на популяции лимфоцитов (CD3+ и CD19+). Отдельно исследовалась остаточная популяция мононуклеаров, не разделившаяся с помощью магнитных шариков. Чистота выделения составила 95% для CD3+ лимфоцитов, 96% для CD19+ лимфоцитов, 93% для гранулоцитов. В остаточной популяции мононуклеаров содержалось не более 0,3% CD19+ и не более 1,91% CD3+ лимфоцитов.

Среднее количество клеток в каждом образце составило $25,4 \times 10^6$ (от $3,2$ до 74×10^6). Из всех образцов была успешно выделена ДНК по общепринятой методике фенол-хлороформной экстракции. Количество выделенной ДНК составило от 5 до 10 мкг. Таким образом, во всех случаях было получено достаточное количество материала для успешного проведения ПЦР.

В результате проведенного исследования образцов костного мозга и клеточных фракций лейкоцитов периферической крови у 17 больных был выявлен полный донорский химеризм во всех клеточных популяциях с+30 дня в течение всего времени наблюдения. У 14 пациентов был выявлен смешанный химеризм хотя бы в одной клеточной популяции. С помощью количественного анализа с использованием компьютерной системы DigiDoc-It (BioRad) было выявлено 3 типа смешанного химеризма: стабильный – в 2-х или более образцах сохраняется одинаковое соотношение донорской и хозяйской ДНК (8 больных); нарастающий – в двух последовательных образцах отмечено нарастание количества донорской ДНК как минимум на 5% (2 больных); убывающий – в двух последовательных образцах выявляется убывание количества донорской ДНК на 5% или более (4 больных). Из них в 1 случае отмечено существование расщепленного химеризма. Эти данные подтверждают возможность независимого существования клеточных популяций донорского

и хозяйского происхождения после ТСКК. На фото 2 представлены примеры различных типов химеризма.

При сопоставлении результатов анализа образцов ДНК, выделенной из цельной популяции ядросодержащих клеток костного мозга, и ДНК, выделенной из разделенных популяций периферической крови, были выявлены следующие закономерности:

1) при исследовании разделенных клеточных популяций смешанный химеризм выявлялся чаще (в 14 случаях из 31, или в 45%), чем при исследовании костного мозга (в 11 случаях из 31, или в 35%), хотя разница не была статистически достоверна.

2) выявление смешанного химеризма в лимфоидных клеточных популяциях явилось статистически значимым для развития рецидивов после ТСКК - у 7 пациентов из 14, по сравнению с 2 из 17, имевшими полный донорский химеризм во всех образцах ($p=0,03$, точный критерий Фишера). Эти данные совпадают с результатами ряда ранее опубликованных работ [8,15,16]. В гранулоцитарной фракции смешанный химеризм определялся реже (8 случаев из 31) и не коррелировал с развитием рецидивов основного заболевания. Особое значение имело выявление убывающего донорского химеризма в лимфоидных популяциях (4 человека). У двоих пациентов после отмены иммуносупрессии смешанный химеризм перешел в возрастающий, а затем в полный донорский. Остальным больным коррекции терапии не проводилось, и впоследствии у них развился рецидив заболевания.

3) Определение полного донорского химеризма по всем клеточным популяциям было статистически значимо для развития хронической реакции «трансплантат против хозяина» ($p=0,03$). Особое значение имел полный донорский химеризм в популяции Т-лимфоцитов. У 11 пациентов с полным химеризмом в Т-клетках в дальнейшем развилась РТПХ, в то время, как ни у одного больного со смешанным Т-клеточным химеризмом этого осложнения не выявлялось [7,17,18,19].

Наши результаты показывают, что исследование различных популяций клеток крови больных, перенесших ТСКК, по гипервариабельным участкам генома может с успехом использоваться для изучения гемопоэтического химеризма в посттрансплантационном периоде. Выявление смешанного химеризма в лимфоидных популяциях периферической крови явилось, по нашим данным, статистически значимым для развития рецидивов основного заболевания, а полный донорский химеризм в популяции Т-клеток коррелировал с развитием хронической РТПХ. Таким образом, изучение гемопоэтического химеризма разделенных клеточных популяций периферической крови имеет определенные преимущества перед исследованием клеток костного мозга: 1) упрощается процедура забора материала для исследования, в связи с чем исследования могут проводиться чаще; 2) повышается чувствительность метода (присутствие собственных клеток реципиента выявляется в большем количестве случаев) 3) выявление убывающего смешанного химеризма в лимфоидных клеточных популяциях позволяет своевременно проводить отмену иммуносупрессии и трансфузии лимфоцитов донора с целью предотвращения рецидива заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bryant E., Martin PJ. 2004. Documentation of engraftment and characterization of chimerism following hematopoietic cell transplantation. In: *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd Edition, Eds Blume KG., Forman SJ, Appelbaum FR. Blackwell Publishing Ltd, Blackwell Publishing Inc., Massachusetts, USA, pp 234-243.
2. Чистяков Д.А., Гаврилов Д.К., Овчинников И.В., Носиков В.В. 1993. Анализ распределения аллелей четырех гипервариабельных tandemных повторов среди неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве. *Молекуляр. Биология*, **27**, 6, 1304-1314.

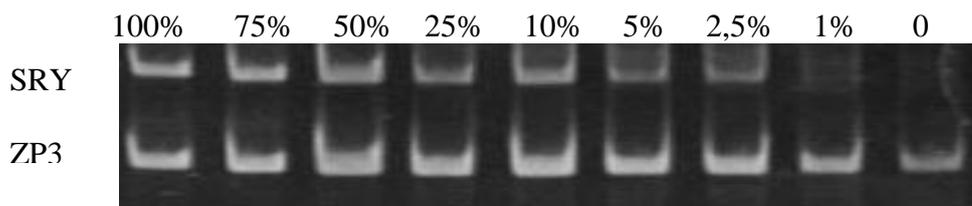
3. Horn G.T., Richards B, Klinger K.W. 1989. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* **17**, 2140
4. Boerwinkle E., Xiong W., Fourest E., Chan L. 1989. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc.Natl.Acad.Sci USA.* **86**, 212-216.
5. Ugozzoli L., Yan P., Petz L.D., Ferrara G.B., Champlin R.E., Forman S.J., Koyal D., Wallace R.B. 1991. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. *Blood.* **77**, 1607-1615.
6. Landman-Parker J., Socie G., Petit ., Raynal B., Bourhis JH., Pico J., Brison O. 1994. Detection of recipient cells after non-T-cell depleted bone marrow transplantation for leukemia by PCR amplification of minisatellites or of a Y chromosome marker that has a different prognostic value. *Leukemia.* **8**, 1989-94.
7. Childs R., Clave E., Contentin N., Jayasakera D., Hensel N., Leitman S., Read E.J., Carter C., Bahceci E., Young N.S., Barrett A.J. 1999. Engraftment kinetics after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood.* **94**, 3234-3241.
8. Wang L-J., Chou P., Gonzalez-Ryan L., Huang W., Haut PR., Kletzel M. 2002. Evaluation of mixed hematopoietic chimerism in pediatric patients with leukemia after allogeneic stem cell transplantation by quantitative PCR analysis of variable number of tandem repeat and testis determination gene. *Bone Marrow Transplant.*, **29**, 51-56.
9. Koehl U., Beck O., Esser R., Seifried E., Klingebiel T., Schwabe D., Seidl C. 2003. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Frankfurt experience. *Leukemia.* **17**, 232-236.
10. Walsh PS., Fildes NJ., Reynolds R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2807-2812.
11. Brownstein MJ., Carpten JD., Smith JR. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques.* **20**, 1004-1010.
12. Antin J.H., Childs R., Phillipovich A.H., Giralt S., Mackinnon S., Spitzer T., Weisdorf D. 2001. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem meetings. *Biol Blood Marrow Transplant.* **7**, 473-485.
13. Gonzales M., Lopez-Perez R., Garcia-Sanz R., Perez-Simon JA., San Miguel JF. 2001 Debate round-table: Comments concerning chimerism studies. *Leukemia.* **15**, 1986-1988.
14. Sreenan J.J., Pettay J.D., Tbakhi A., Totos G., Sandhaus LM., Miller ML., Bolwell B., Tubbs RR. 1997, The use of amplified variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation: a comparison with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by southern blotting. *Am J Clin Pathol.* **107**, 292-298.
15. Lion T., Daxberegger H., Dubovsky J., Filipick P., Fritsch G., Printz D., Peters C., Matthes-Martin S., Lawitschka A., Gadner H. 2001. Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* **15**, 307-310.
16. Mattson J., Uzunel M., Tammik L., Aschan J., Rindgen O. 2001. Leukemia specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* **15**, 1976-85.
17. Choi SJ., Lee KH., Kim S., Chung HJ., Lee JS., Park CJ., Chi HS., Kim WK. 2000. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.* **26**, 327-332.
18. McSweeney PA., Niederweiser D., Shizuru JA., Sandmaier BM., Molina AJ., Maloney DG., Chauncey TR., Gooley TA., Hegenbart U., Nash RA., Radich J., Wagner JL., Minor S., Appelbaum FR., Besinger WI., Bryant E., Flowers MED., Georges GE., Grumet FC., Keim HP., Torok-Storb B., Yu C., Blume KG., Storb RF. 2001. Hematopoietic cell transplantation in older patients with

hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus tumor effects. *Blood*. **97**, 3390-3400.

19. Girgis M., Hallermeier C., Blum W., Brown R., Lin HS., Khoury H., Goodnough L.T., Vij R., Devine S., Wehde M., Postma S., Oza A., DiPersio J., Adkins D. 2005. Chimerism and clinical outcomes of 110 recipients of unrelated donor bone marrow transplants who underwent conditioning with low-dose, single exposure total body irradiation and cyclophosphamide. *Blood*. **105**, 3035-3041.

Рисунок 1.

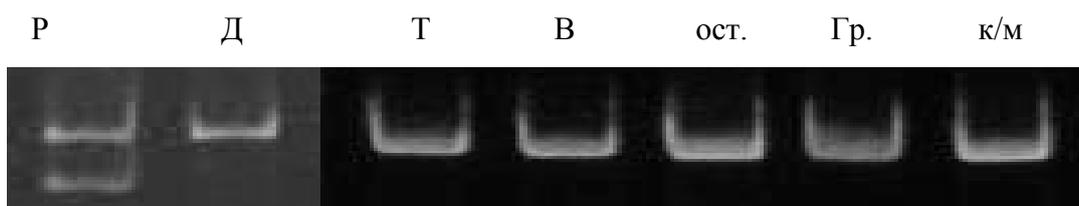
Чувствительность использованной методики на примере комбинированной амплификации локусов SRY/ZP3



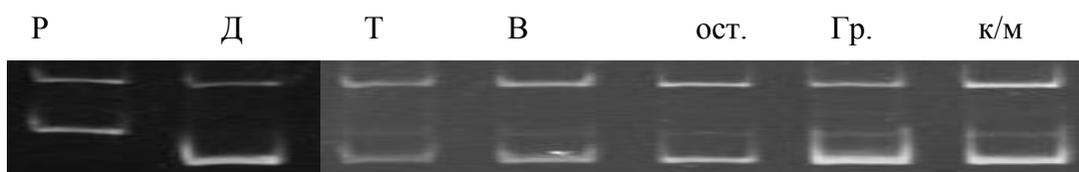
Указано процентное содержание ДНК, несущей SRY в смеси.

Рис 2. Типы химеризма

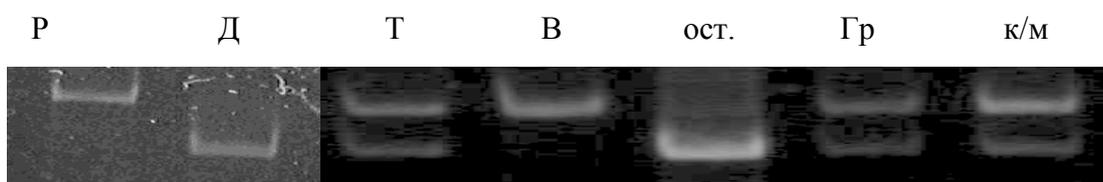
а) Полный донорский химеризм



б) Смешанный химеризм во всех клеточных популяциях



в) Расщепленный химеризм



Примечание: Р - реципиент, Д - донор, Т – Т-лимфоциты (CD3+), В – В-лимфоциты (CD19+), ост. – остаточная популяция мононуклеаров, гр. – фракция гранулоцитов, к/м – костный мозг