

Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами

В.А. Лавриненко, Т.В. Савицкая, Е.В. Волоchnik, Ю.Е. Марейко, О.В. Алейникова

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск

Контакты: Виктория Александровна Лавриненко viallav@mail.ru

Количественный мониторинг химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярными методами стал обязательным диагностическим инструментом для определения степени приживления трансплантата или его отторжения, а также предсказания рецидива основного заболевания. Несмотря на широкое применение анализа химеризма, до сих пор вызывает дискуссию выбор стандартного количественного лабораторного метода для его рутинного использования. В данном исследовании мы сравнили 2 молекулярных метода определения гемопоэтического химеризма: мультиплексную полимеразную цепную реакцию коротких tandemных повторов (STR-ПЦР) с последующим фрагментным анализом и амплификацию полиморфизмов инсерция/делеция с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (InDel-ПЦР). Мы выполнили исследование химеризма у 60 пациентов с помощью STR-ПЦР и InDel-ПЦР. Для всех пар донор/реципиент были обнаружены информативные STR-аллели (100 %), тогда как информативные аллели для реципиента методом InDel-ПЦР — только в 88 % пар. Чувствительность STR-ПЦР и InDel-ПЦР составила 1–5 % и более 0,01 % соответственно. Точность определения количества была выше для STR-PCR, чем для InDel-PCR, при уровне донорского химеризма 3–97 %. Таким образом, наиболее оптимальным подходом для мониторинга гемопоэтического химеризма у пациентов с уровнем химеризма менее 5 % или более 95 % является использование InDel-ПЦР, а при уровне химеризма 5–95 % для мониторинга рекомендуется использование STR-PCR.

Ключевые слова: химеризм, короткие tandemные повторы, полиморфизмы инсерция/делеция, полимеразная цепная реакция, флуоресцентная *in situ* гибридизация, трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods

V.A. Lavrinenko, T.V. Savitskaya, Ye.V. Volochnik, Yu.E. Mareiko, O.V. Aleynikova

Republican Scientific Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of Republic of Belarus, Minsk

Quantitative monitoring of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) by molecular methods has become a significant diagnostic tool in detection of engraftment/graft failure, predicting rejection and disease relapse. Despite the great utility of chimerism analysis there is not a unique standard method for its quantification. The objective of the present investigation was to compare perspective methods multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction (STR-PCR) and real-time PCR insertion/deletion polymorphisms (InDel-PCR) for the quantification of chimerism after HSCT. We performed a study analyzing the chimerism status in 60 patients by STR-PCR and by InDel-PCR. Recipient/donor discrimination was possible with STR-PCR in all patient-donor pairs (100 %), whereas informative alleles for recipient were found in 88 % pairs with InDel-PCR. The sensitivity (detection limit) of STR-PCR and InDel-PCR was 1–5 % and more than 0.01 % donor cells correspondingly.

The accuracy of quantification was higher for STR-PCR than for InDel-PCR, when level of donor chimerism was 3–97 %. These methods can be successfully used to determine chimerism after allogeneic HSCT. Considering the higher sensitivity and quantification accuracy of InDel-PCR it should be chosen if donor chimerism level less 5 % or more 95 % and in other cases STR-PCR should be chosen.

Key words: chimerism, short tandem repeats, insertion/deletion polymorphisms, polymerase chain reaction, fluorescence *in situ* hybridization, hematopoietic stem cell transplantation

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от родственных и неродственных доноров часто является единственным способом лечения различных злокачественных и незлокачественных заболеваний. Однако успех аллогенной ТГСК (алло-ТГСК) ограничивают многочисленные посттрансплантационные осложнения: отторжение трансплантата, развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), рецидивы основного заболевания. В связи с этим изучение динамики гемопоэтического химеризма и определение ее связи с перечисленными осложнениями

играет важнейшую роль для правильной оценки состояния больного и проведения дальнейших лечебных мероприятий [1]. Поэтому актуальной задачей является выбор наиболее надежных, информативных и чувствительных методик количественной оценки донорского химеризма (ДХ) после проведенной алло-ТГСК [2].

Существует ряд методов оценки химеризма, включая цитогенетические и молекулярно-биологические, в которых в качестве мишеней используют различные ДНК-маркеры (в основном повторы ДНК, а также ряд вариантов уникальных генов) [3]. Одними из наиболее

перспективных и информативных методик являются метод флуоресцентной *in situ* гибридизации — FISH (fluorescence *in situ* hybridization), метод амплификации и анализа продуктов мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) коротких tandemных повторов (STR, short tandem repeat) и ПЦР в реальном времени (например, полиморфизмов инсерция/делеция (InDel, insertion/deletion)) [4–6].

Метод FISH с помощью синтетических ДНК-зондов, гибридизируемых с искомыми участками ДНК в интерфазных ядрах, был внедрен в цитогенетическую диагностику химеризма в 90-е годы и используется при несовместимых по полу алло-ТГСК [2, 6]. Достоинство методики заключается в возможности прямого подсчета доли клеток донора и реципиента. Главным недостатком FISH-исследования является его низкая информативность (ограничена только несовместимыми по полу алло-ТГСК) [7].

Метод STR-ПЦР основан на анализе продуктов амплификации повторяющихся последовательностей ДНК — STR-повторов. Каждый STR (или микросателлит) маркер имеет характерную хромосомную локализацию и представляет собой короткую нуклеотидную последовательность ДНК (2–7 пар оснований), которая многократно tandemно повторяется от 4 до 50 раз [5].

Для амплификации STR-локусов обычно используется мультиплексная ПЦР с мечеными разными флуоресцентными красителями несколькими парами праймеров, комплементарными к последовательностям ДНК, которые фланкируют эти микросателлиты. В результате STR-ПЦР образуется набор фрагментов разной длины в зависимости от количества tandemных повторов [2]. В настоящий момент для разделения и детекции продуктов ПЦР используют фрагментный анализ методом капиллярного электрофореза. Размер ПЦР-фрагмента каждого маркера (локуса STR) и его относительное количество оценивают, исходя из показателей относительной флуоресценции и времени детекции сигнала [5]. Диагностика химеризма на основе методов, использующих STR в качестве маркера, на сегодняшний день самый широко используемый подход для анализа приживления стволовых клеток.

Главным преимуществом InDel-ПЦР по сравнению с мультиплексной STR-ПЦР при исследовании химеризма является отсутствие конкуренции в ПЦР и влияния плато реакции, и, как результат, большая чувствительность [7].

Полиморфизм инсерция/делеция (InDel) — тип генетической вариации, при которой специфическая нуклеотидная последовательность присутствует (инсерция) или отсутствует (делеция). InDel находятся в кодирующей области гена и могут быть кратны и не кратны 3 нуклеотидам, что приводит к мутациям со сдвигом рамки считывания [8].

При выборе мишеней для исследования методом InDel-ПЦР руководствуются следующими критериями: биаллельные полиморфизмы (InDel) должны от-

личаться, по крайней мере, двумя последовательными вариабельными основаниями и показывать высокий уровень гетерозиготности в популяции в целом. Для каждой биаллельной системы один из праймеров выбирают в полиморфном регионе для специфической амплификации каждого аллеля, тогда как 2-й праймер расположен в общем регионе, при этом TaqMan-проба является общей для обоих аллелей [7]. Количественная ПЦР InDel полиморфизмов обладает чувствительностью 10^{-4} (ограниченной в основном количеством ДНК в реакции), так же как и хорошей воспроизводимостью и высокой точностью [4].

Благодаря высокой чувствительности, по сравнению с обычной мультиплексной STR-ПЦР, метод InDel-ПЦР может использоваться для определения остаточных клеток реципиента у пациентов с острыми лейкозами после алло-ТГСК и может предсказать рецидив основного заболевания в значительно большем количестве случаев (практически в 2 раза чаще согласно исследованиям A. Jiménez-Velasco et al.) [4].

С учетом современных данных, целью собственных исследований стала оптимизация методов для мониторинга гемопоэтического химеризма после алло-ТГСК, на основе оценки информативности маркеров (InDel, STR-полиморфизмы, XY-маркеры) для пары донор/реципиент, сравнения чувствительности и точности количественного определения мультиплексной STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом, InDel-ПЦР в реальном времени и FISH.

Материалы и методы

В анализ было включено 575 образцов костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) от 60 пациентов после алло-ТГСК, выполненных в 2011–2013 гг. в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. Определение химеризма осуществляли с помощью STR-ПЦР с последующим фрагментным анализом у всех 60 пациентов (480 посттрансплантационных образцов) и InDel-ПЦР у 42 пациентов (294 посттрансплантационных образца). Скрининг методом InDel-ПЦР был проведен у всех пациентов, в анализ были включены только больные, для которых были найдены информативные маркеры для реципиента. Методом FISH было обследовано 19 пациентов (75 посттрансплантационных образцов). Взятие ПК и/или КМ для исследований проводили на +14, +21, +30, +45, +60, +80, +100, +140, +180, +245, +365-й дни и каждые последующие полгода.

Мононуклеарные клетки выделяли из ПК и КМ на градиенте плотности Histopaque (Sigma-Aldrich, США).

Выделение ДНК выполняли фенол-хлороформной экстракцией. Концентрацию и качество образцов ДНК оценивали на UV-спектрофотометре (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, США).

Оптимизация методик была выполнена на серии разведений клеток от 2 разнополюх здоровых волон-

теров, смешанных в различных пропорциях, % (100; 50; 25; 10; 5; 3; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0).

Для амплификации STR использовали коммерческий набор AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (ABI, UK), который содержал смесь праймеров к 10 локусам STR и локусу амелогенина для мультиплексной ПЦР. Реакцию ПЦР проводили с использованием 4 нг исследуемой ДНК. Разделение продуктов ПЦР производили с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Идентификацию аллелей проводили с использованием оригинального программного обеспечения GeneMapper (Applied Biosystems, США). При несовпадении аллелей у пары донор/реципиент их рассматривали как информативные и использовали в дальнейшем для подсчета химеризма в посттрансплантационных образцах. Рассчитывали ДХ как соотношение сигналов флуоресценции информативных аллелей донора и реципиента по относительной высоте пиков:

ДХ, % = (Σ ДНК донора)/Σ общей ДНК в локусе × 100 %.

Для исследования методом InDel-ПЦР была выбрана панель праймеров, предложенная М. Alizadeh et al. [7], разработанная на основе биаллельных коротких полиморфизмов инсерций/делеций человека. В панель праймеров были также включены праймеры и зонды ACE 1428, ACE 1721, GST 194, предложенные М. Koldehoff et al. [9]. Первоначально донора и реципиента генотипировали по 22 аллель-специфическим маркерам. Аллели учитывали как позитивные, если значение Ct (пороговый цикл) было в пределах 20–26, и негативные, если значение Ct превышало 40 или отсутствовала амплификация. Аллели считали информативными, если они были позитивными для реципиента и негативными для донора или наоборот. В качестве референсного гена был выбран ген альбумина *ALB*.

ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере StepOnePlus (Life Technologies, США) в объеме 20 мкл. При уровне ДХ > 90 % диагностировали остаточные клетки реципиента по 1–2 информативным аллелям реципиента и уровень ДХ вычисляли по формуле:

ДХ, % = 100 % – % клеток реципиента.

Для определения чувствительности ПЦР в реальном времени строили калибровочную кривую для выбранных информативных аллелей донора и реципиента и контрольного гена *ALB* на основании серии разведений ДНК донора в ДНК реципиента и наоборот (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Для подсчета уровня химеризма использовали следующую формулу [7]:

$$\text{ДХ, \%} = 100 \% \times (1 + E)^{-(\Delta\text{CtU} - \Delta\text{CtC})}$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{мишени}} - \text{Ct}_{\text{ABL}},$$

где ΔCtU — значение ΔCt в неизвестном образце; ΔCtC — значение ΔCt в калибраторе (в образце до трансплантации); E — эффективность амплификации исследуемой последовательности ДНК (мишени).

Для исследований химеризма методом FISH клетки ПК/КМ подвергали краткосрочному культивированию в среде RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10 % телячью эмбриональную сыворотку (термически инактивированную), глютамин и антибиотик. Затем фиксировали в смеси метанол + уксусная кислота (3:1) и окрашивали коммерческими зондами CEP X/Y Dual Color Probe (Abbott, США) по стандартной методике фирмы-производителя.

Статистическая обработка полученных нами данных проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Для оценки сопоставимости 2 методов применяли подход, предложенный Bland и Altman, для определения согласованности результатов первого и второго измерения мы вычислили коэффициент вариации парных измерений (MedCalc).

Результаты и обсуждение

Информативность аллелей. Начальный этап количественного анализа химеризма — выявление информативных аллелей, маркерных локусов, по которым различаются донор и реципиент.

При использовании метода STR-ПЦР для всех 60 (100 %) пар донор/реципиент были обнаружены информативные аллели, при этом их количество у одного и того же пациента составляло 3 и более. При родственной алло-ТГСК количество информативных аллелей в парах донор/реципиент составило 3–10 (медиана — 7), при неродственной алло-ТГСК — 7–11 (медиана — 10). Информативность отдельных локусов была высокой — от 78 % всех пар и выше, при этом информативность амелогенина, отражающего количество пар донор/реципиент, не совпадающих по полу, составила 57 % (табл. 1).

Для всех пар донор/реципиент при диагностике методом InDel-ПЦР были также обнаружены информативные аллели (100 %). Количество информативных аллелей в паре донор/реципиент составило от 1 до 11, 1–10 (медиана — 4) при родственной и 1–11 (медиана — 7) — при неродственной алло-ТГСК. Информативность отдельных локусов была не выше 51,1 % (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, информативность ряда локусов была низкой (наблюдалась неспецифи-

Таблица 1. Информативность STR-локусов в парах донор/реципиент

Локусы	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	amelogenin	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
Информативность, %	80	89	78	91	57	83	86	93	89	78	90

Таблица 2. Информативность используемых InDel-локусов

Локус	S01a	S01b	S02	S03	S04a	S04b	S05a	S05b	S06	S07a	S07b	S08a	S08b	S09a	S09b	S10a	S10b	S11a	S11b	ACE1428	ACE1721	GST194
Информативность, %	47,2	0	47,2	35,1	51,4	11,1	0	35	27	47	40,5	38,9	32,4	0	30,6	0	25	47,2	25	0	30,6	22,2

ческая амплификация до 40 цикла), такие аллели в последующем были исключены из панели праймеров (S01b, S05a, S09a, S10a, ACE 1428).

При диагностике методом InDel-ПЦР аллели могут быть информативными для донора (аллель донора амплифицируется и не амплифицируется аллель реципиента) и для реципиента (наоборот, амплифицируется только аллель реципиента). Однако при уровне ДХ > 90 % предпочтительнее его мониторировать по остаточным клеткам реципиента. При этом маркеры, специфичные для реципиента, были определены для 53 из 60 пар донор/реципиент (88,3 %). Таким образом, метод InDel-ПЦР с использованием 17 маркеров позволял дискриминировать почти в 90 % пар реципиент/донор.

В наших исследованиях мониторинг химеризма методом FISH с использованием зондов к X- и Y-хромосомам был возможен только у 57 % пар, различающихся по полу.

Таким образом, используемая панель STR-маркеров достаточна для определения гематологического химеризма при любом сочетании донора и реципиента, в то время как при использовании InDel — только у 88 % и FISH — у 57 % пар.

Чувствительность методов. С помощью серийных разведений клеток одного волонтера в клетках другого, которые различались по полу, была определена чувствительность методов, которая составила для STR-ПЦР и FISH 1 % и для InDel-ПЦР — 0,01 %. Таким образом, метод STR-ПЦР имеет невысокую чувствительность, что ограничивает его использование для

определения минимальной остаточной болезни, чувствительность для определения которой должна быть 10^{-3} – 10^{-6} [10]. Следует также упомянуть о неодинаковой эффективности амплификации отдельных локусов в мультиплексной ПЦР при выполнении STR-ПЦР, результатом которой является неодинаковая чувствительность локусов от 1 до 10 %, при этом самая низкая была у локуса FGA (табл. 3).

Мы вносили в реакцию 4 нг ДНК, что эквивалентно содержанию ДНК 450 соматических клеток (6,6 пг/клетка), отсюда теоретически возможная чувствительность метода STR-ПЦР составляет не более 2,2 %. При увеличении вносимого в реакцию количества ДНК возникает ряд артефактов (см. ниже), которые могут значительно исказить значение химеризма.

Чувствительность метода InDel-ПЦР определяли в образцах искусственных разведений клеток от 2 разнородных здоровых волонтеров, смешанных в различных пропорциях (% мужчина: 100; 50; 25; 10; 5; 3; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0), а также для каждой реакции с выбранными информативными аллелями донора и реципиента по серии разведений ДНК донора в ДНК реципиента и наоборот (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) для построения калибровочной кривой. Чувствительность метода составила 10^{-4} – 10^{-5} в зависимости от маркера. В реакцию InDel-ПЦР брали 120 нг ДНК, что соответствует приблизительно 18 000 клеток, т.е. теоретическая чувствительность метода составила 0,0056 %, т.е. значения < 0,01 % можно считать за артефакт и принимать значение химеризма за 0 %.

Таблица 3. Чувствительность метода STR-ПЦР, % в отдельных информативных локусах

Локусы	Разведения клеток						
	75	50	25	10	5	3	1
	Чувствительность, %						
D3S1358	76,62	51,61	26,23	11,28	4,56	3,65	3,64
D2S1338	75,17	53,19	24,61	9,10	8,00	4,55	2,20
amelogenin	71,25	51,64	25,68	10,48	6,24	4,97	0,00
D21S11	72,45	48,16	25,50	8,50	6,69	6,83	0,00
TH01	75,56	56,00	26,10	13,05	6,87	0,00	0,00
FGA	82,21	61,54	23,97	11,62	0,00	0,00	0,00
Среднее значение	74,21 ± 3,84	52,12 ± 4,61	25,63 ± 0,89	10,48 ± 1,68	6,47 ± 2,86	4,00 ± 2,87	2,92 ± 1,58

По нашим результатам, линейность амплификации достоверно соблюдалась до разведения 10^{-4} . После разведения 10^{-4} было невозможно с высокой точностью определить значение химеризма количественно, так как в разведении 10^{-5} наблюдали разброс значений более чем на 0,5 цикла (рис. 1). Учитывая вышеизложенное, мы принимали значения менее 0,01 % клеток реципиента за 100 % ДХ.

В собственных исследованиях чувствительность метода FISH составила 1–5 %. Нужно отметить, что и по данным литературы чувствительность FISH сопоставима с STR-ПЦР в случае трансплантации от несовместимого по полу донора [5].

Таким образом, метод InDel-ПЦР имеет существенное преимущество в чувствительности перед мето-

дами STR-ПЦР и FISH, что особенно привлекательно для диагностики микрохимеризма.

Точность и воспроизводимость методов. Современные технологии на основе STR-мишеней имеют методологические особенности, которые влияют на точность измерения и могут привести к ошибкам интерпретации количественного уровня химеризма.

При применении STR-ПЦР большую погрешность в точность измерения уровня химеризма могут вносить так называемые «stutter» пики, которые возникают в результате «скольжения» полимеразы в процессе амплификации или, иными словами, «перескока» полимеразы на одну повторяющуюся единицу STR. При использовании тетрануклеотидных STR они появляются на 4 нуклеотида раньше амплифицируемого

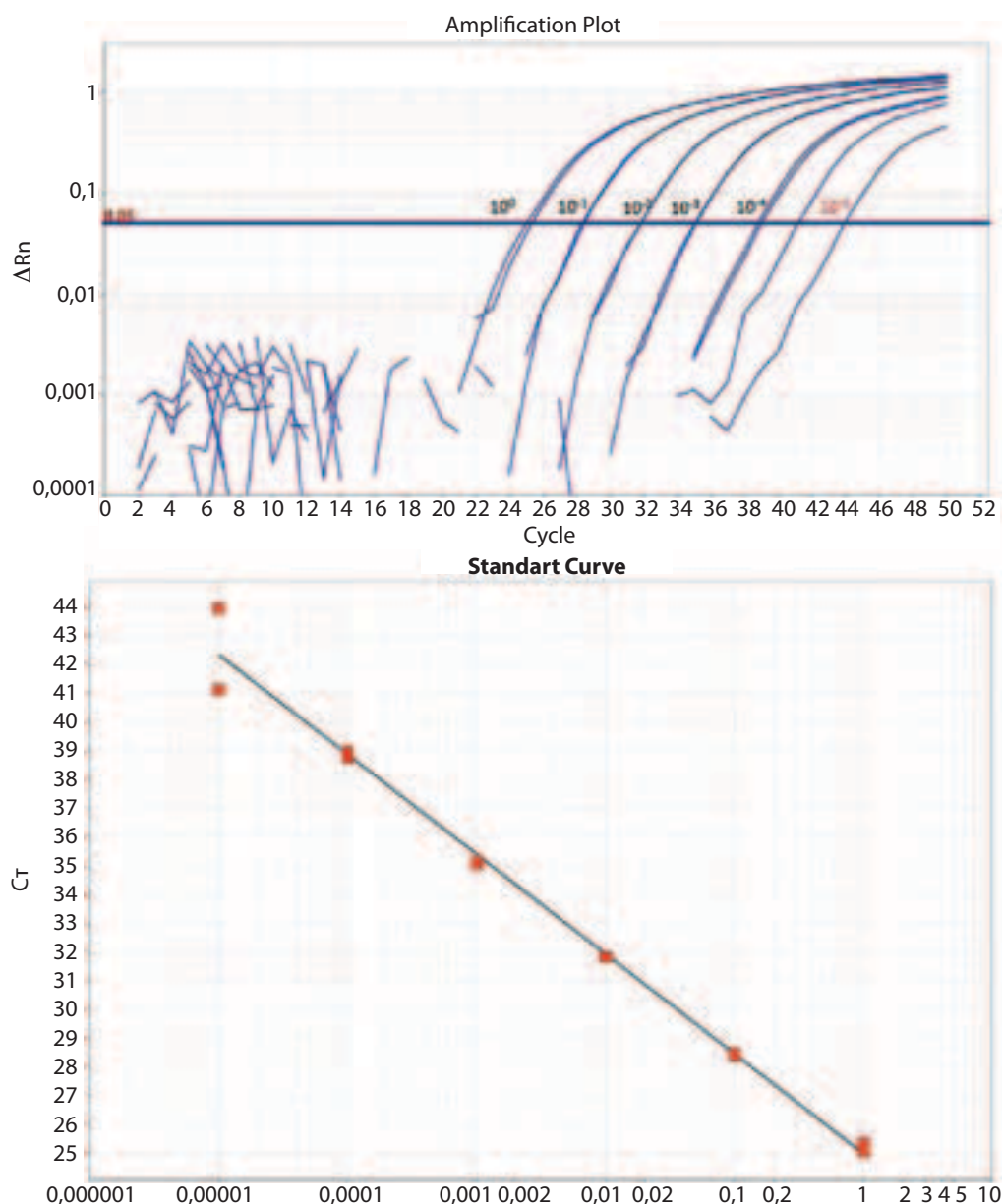


Рис. 1. Чувствительность и линейная зависимость между разведением и порогом амплификации метода InDel-ПЦР

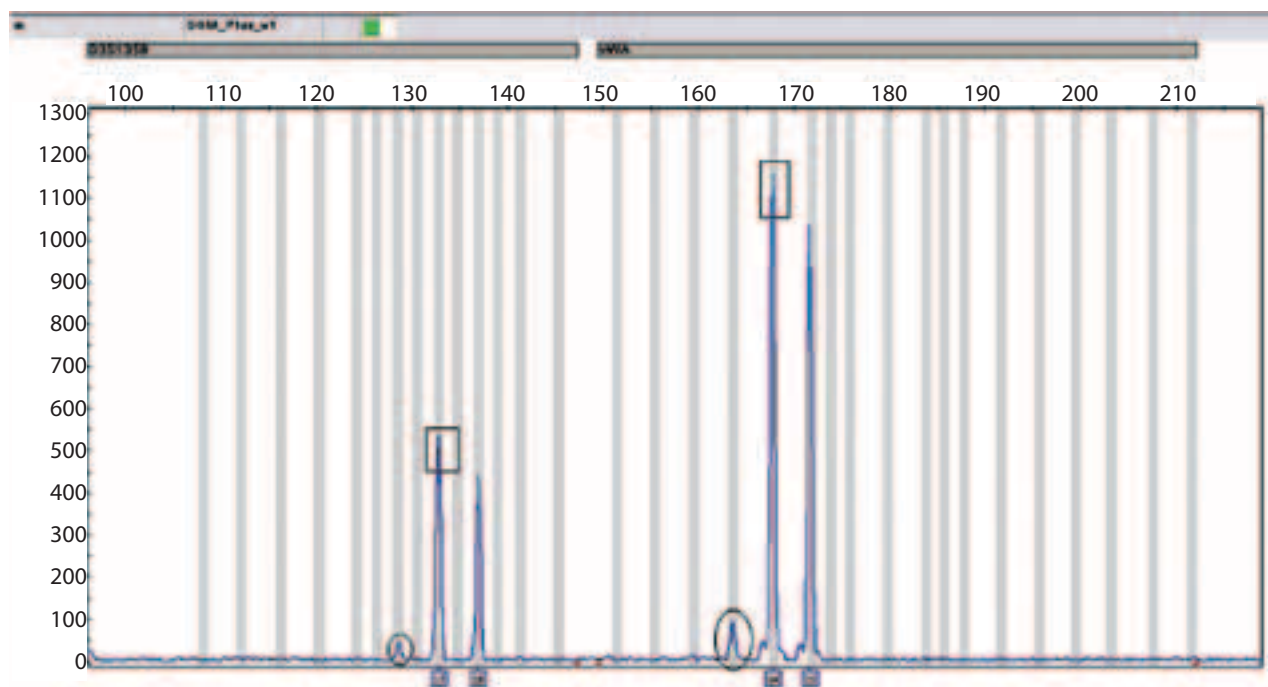


Рис. 2. Расположение «stutter» пиков для аллелей 18 и 15, 17 и 14. В кружке — «stutter» пики аллелей 17 и 14; в прямоугольнике — возможные «stutter» пики аллелей 18 и 15, которые могут делать вклад в высоту предшествующих пиков аллелей 17 и 14 соответственно

аллеля на электрофореграмме [11]. «Stutter» пики могут давать 5–15 % погрешность в высоте и площади пиков, перекрывающихся с ними по размеру, а также симулировать картину смешанного химеризма при его низком уровне, если информативный аллель реципиента одновременно мигрирует со «stutter» пиком донорского аллеля [2, 11] (рис. 2).

«Stutter»-подобные пики могут появляться также после главного пика (echo peaks) [11]. Такие локусы должны быть исключены из анализа, особенно когда четко определено наличие низкого уровня химеризма в других локусах. Эти факты следует учитывать при подсчете уровня химеризма, особенно при его очень низких значениях (стремящихся к 0 % ДХ) или при очень высоких (стремящихся к 100 % ДХ).

Разная эффективность амплификации аллелей или аллельный дисбаланс также влияет на точность метода и является общим источником вариации, приводящей к ≤ 15 % разнице в пределах пары аллелей донора или реципиента в 70–100 % случаев в зависимости от маркера [11].

Также погрешности существуют при использовании метода InDel-ПЦР. В отличие от метода STR-ПЦР, где аллели реципиента и донора амплифицируются в одной пробирке, метод InDel-ПЦР основан на использовании специфических праймеров и проб, которые амплифицируют аллели реципиента и донора в различных пробирках. При этом условия амплификации аллелей донора и реципиента наиболее оптимальны и сходны при STR-ПЦР, в то время как при InDel-ПЦР разница в условиях амплификации между дублями влияет на точность определения значения

химеризма. Допускаемая погрешность измерения порогового значения $Ct \pm 0,5$ между дублями, что соответствует вариации количества ДНК до 50 % (коэффициент вариации парных измерений — 0–50 %). При низких значениях химеризма эта погрешность незначительна, а при высоких — недопустима. Для сравнения, 100 % химеризм при измерении может давать значения между 75 % и 150 %, что непригодно для измерения химеризма, а при значении 1 % может давать значения между 0,75 % и 1,5 %, что вполне допустимо.

В 2 повторных исследованиях на серии разведений клеток мы определяли воспроизводимость используемых методов. Полученные результаты представлены в табл. 4 и на рис. 3. Как видно из данных табл. 4, наиболее точные результаты по количественному определению химеризма в серии клеточных разведений мы получили при использовании STR-ПЦР, затем FISH и менее точные — при InDel-ПЦР. Наиболее надежные результаты получены методом STR-ПЦР при уровне химеризма ≥ 3 % и ≤ 97 % ДХ (что соответствует ≥ 3 % химеризму реципиента). При использовании мультиплексной STR-ПЦР возможно независимо посчитать значение ДХ для каждого информативного локуса и среднее, для получения более точного результата, а также оценить статистическую вариабельность и надежность результатов [7]. При низких значениях химеризма (< 3 % и при определении уровня ДХ по клеткам реципиента > 97 %) коэффициент вариации для 2 молекулярно-генетических методов сопоставим (для STR-ПЦР коэффициент вариации парных измерений составляет 33,6 % при 1 % ДХ, 51,38 % — для InDel-ПЦР). Низкая точность результатов методом STR-ПЦР вне

Таблица 4. Значения химеризма, полученные методами STR-ПЦР, InDel-ПЦР и FISH на серии разведений клеток

Значение химеризма, %	Разведения клеток									
	100	75	50	25	10	5	3	1	0,1	0,01
STR-ПЦР, тест 1	100	74,21	52,12	25,63	10,48	6,47	4,00	2,92	0,00	0,00
STR-ПЦР, тест 2	100	75,31	52,58	25,57	10,58	6,05	4,47	1,80	0,00	0,00
Коэффициент вариации парных измерений		1,04	0,62	0,17	0,67	4,74	7,85	33,56		
InDel-ПЦР, тест 1	91,12	132,87	77,49	25,66	13,18	5,36	3,49	1,56	0,06	0,01
InDel-ПЦР, тест 2	96,50	59,47	42,42	20,33	6,96	3,09	1,63	0,60	0,04	0,01
Коэффициент вариации парных измерений	4,06	53,97	41,36	16,39	16,39	43,68	37,99	51,38	28,28	
FISH	100	80,3	53,3	28,3	13,3	5,7	2,3	0,67	0	0

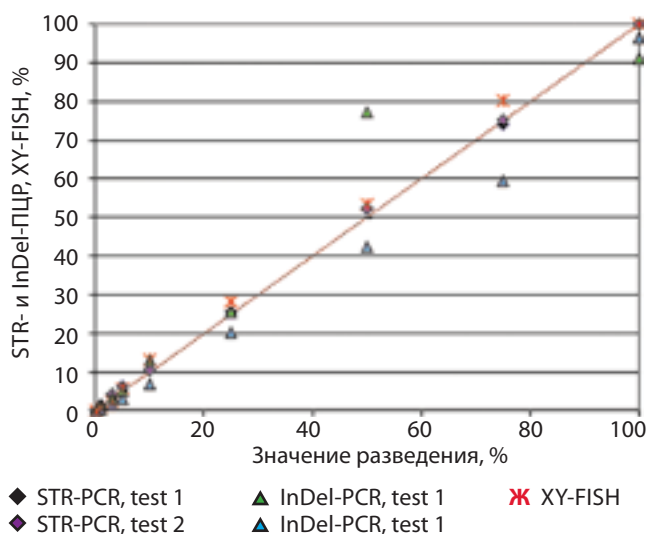


Рис. 3. Значения химеризма, полученные методами STR-ПЦР, InDel-ПЦР и FISH на серии разведений клеток

этого интервала обусловлена ограниченной чувствительностью в отдельных локусах (1–10 %).

Таким образом, методики на основе STR-ПЦР и фрагментного анализа наиболее гибкие и универсальные, и подходят для рутинного количественного определения химеризма [7]. Тем не менее главное достоинство InDel-ПЦР заключается в более высокой чувствительности, что делает возможным мониторинг химеризма при его низких (< 5 %) и высоких (> 95 %) значениях и позволяет выявлять изменения значительно раньше.

Сопоставимость результатов, полученных разными методами. Для определения сопоставимости результатов 2 методов часто используют коэффициент корреляции, но он не всегда подходит для характеристики диагностических методов. Поэтому мы использовали метод Бланда–Альтмана, который применяется для сравнения 2 методов, каждый из которых имеет собственную ошибку измерения [12, 13]. Это метод основан

на графическом представлении различия между значениями, полученными двумя методами в 1 образце, против их значения и на вычислении пределов сопоставимости (обозначают $d - 2SD$ и $d + 2SD$, где значение d – различие измерения и SD – стандартное отклонение различия). Этот метод дает ответ на вопрос, сопоставимы ли результаты, полученные двумя методами, и насколько они сопоставимы. Считается, что 2 метода коррелируют, когда различия измерений статистически несущественны, потому что они включены в 95 % доверительный интервал. Сопоставимость методов STR-ПЦР и InDel-ПЦР показана на рис. 4 для серии разведений и для клинических образцов на рис. 5.

Как видно из графиков, результаты, полученные двумя методами, хорошо сопоставимы при низких значе-

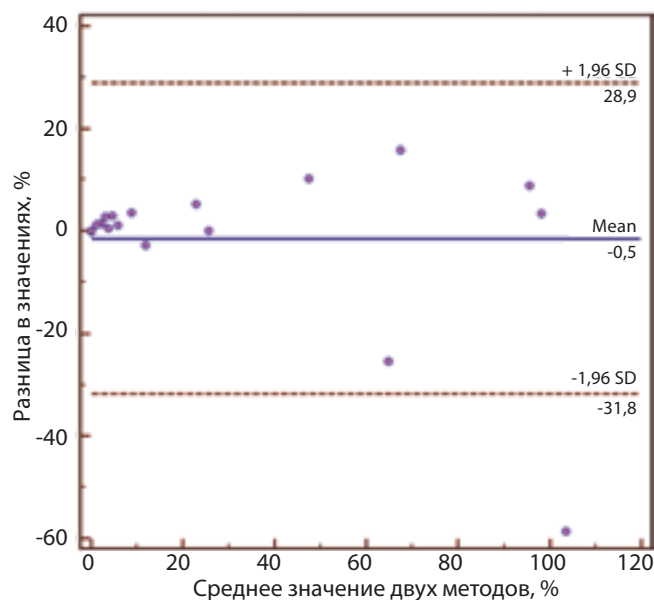


Рис. 4. Сравнение значений химеризма по Бланду–Альтману, полученных методами STR-ПЦР и InDel-ПЦР на серии разведений. График отображает разницу в значениях, полученных обоими методами против среднего значения химеризма

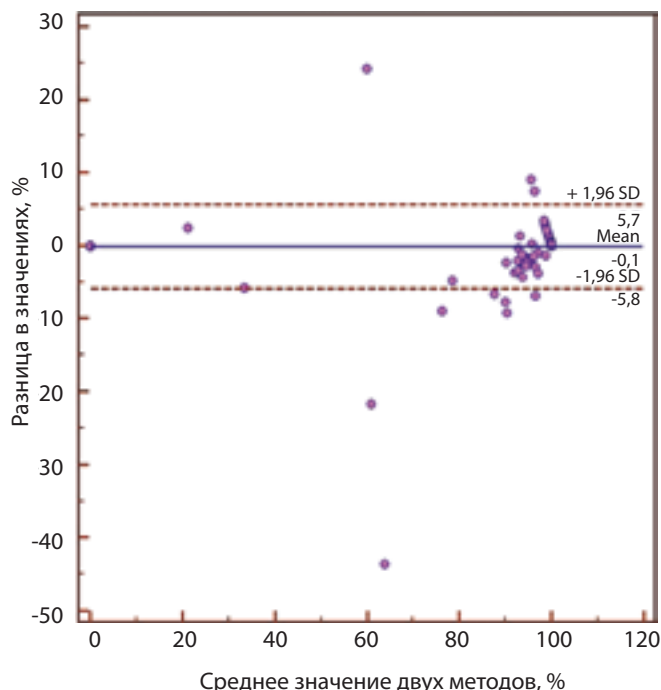


Рис. 5. Сравнение значений химеризма по Бланду—Альтману, полученных методами STR-ПЦР и InDel-ПЦР в образцах пациентов после алло-ТГСК. График отображает разницу в значениях, полученных обоими методами против среднего значения химеризма. Значения ДХ у большинства пациентов были близки к 100 %

ниях химеризма (для клинических образцов при уровне химеризма, близком к 100 % ДХ, расчет химеризма производился по остаточным клеткам реципиента, что соответствует низкому «химеризму реципиента», поэтому результаты хорошо сопоставимы в этой области). Однако при уровне химеризма, приближающемся к 50 %, как и ожидалось, наблюдается заметное расхождение результатов, полученных методом InDel-ПЦР, с другим методом из-за его низкой точности измерения в этом интервале.

Заключение

Таким образом, наиболее оптимальным подходом для мониторингирования гемопоэтического химеризма у пациентов с уровнем клеток реципиента выше 5 % или с уровнем химеризма 5–95 % является использование STR-ПЦР-метода с последующим фрагментным анализом. При уровне химеризма менее 5–10 % или больше 90–95 % (в частности, после миелоаблативных режимов кондиционирования) и особенно у пациентов, для которых необходимо достижение максимально полного ДХ, для мониторинга рекомендуется использование количественной InDel-ПЦР в реальном времени как метода с более высокой чувствительностью. В других случаях, например, в отсутствие информативных маркеров, должен быть выбран метод STR-ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lion F., Watzinger S., Preuner H. et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2012;26(8):1821–8.
2. Antin J.H., Childs R., Filipovich A.H. et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings of the international bone marrow transplant registry and the American society of blood and marrow transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant* 2001;7(9):473–85.
3. Чухловин А.Б., Фезе Б., Зарайский М.И. и др. Принципы молекулярно-генетической оценки гемопоэтического химеризма и области его применения в гематологии. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в педиатрии* 2002;1(1):70–4.
4. Jiménez-Velasco A., Barrios M., Roman-Gomez J. et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphism. *Leukemia* 2005;19(3):336–43.
5. Kristt D., Stein J., Yaniv I. et al. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):255–68.
6. Khan F., Agarwal A. and Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(1):1–12.
7. Alizadeh 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(12):4618–25.
8. Rodriguez-Murillo L. and Salem R.M. Insertion/Deletion Polymorphism. In M.D. Gellman & J.R. Turner (eds.). *Encyclopedia of behavioral medicine*. New York: Springer, 2013; part 16:1076.
9. Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M. et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006;81(10):735–46.
10. van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901–28.
11. Kristt D., Israeli M., Narinski R. et al. Hematopoietic chimerism monitoring based on STRs: quantitative platform performance on sequential samples. *J Biomolecular Techniques* 2005;16(4):378–89.
12. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;327(8476):307–10.
13. Hanneman S.K. Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN Adv Crit Care* 2008;19(2):223–34.