

PRACA ORYGINALNA – Original Article

KATARZYNA GUZ¹, JUSTYNA SMOLARCZYK-WODZYŃSKA¹, MAŁGORZATA DAWIDOWSKA², JUSTYNA JÓŁKOWSKA-BARANIAK², AGNIESZKA ORZIŃSKA¹, JOANNA SKULIMOWSKA³, JADWIGA SAWECKA³, MONIKA KRASZEWSKA², AGNIESZKA TOMASZEWSKA⁴, BARBARA NASIŁOWSKA-ADAMSKA⁴, BOŻENA MARIAŃSKA⁴, JACEK WACHOWIAK⁵, MICHAŁ WITT², EWA BROJER¹

Ocena chimeryzmu po przeszczepieniu allogenicznych komórek krwiotwórczych przy pomocy metody RQ-PCR – standaryzacja metody i porównanie z techniką STR-PCR

Evaluation of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using the RQ-PCR method – its standardization and comparison with the STR-PCR method

¹Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer

²Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. med. Michał Witt

³Zakład Biochemii, Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: Dr hab. n. med. Ewa Zdebska[†]; obecnie Zakład Immunogenetyki
Kierownik: Dr med. Jacek Nowak

⁴Klinika Transplantacji Komórek Krwiotwórczych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: Prof. dr hab. med. Bożena Mariańska

⁵Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek Wachowiak

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono wyniki standaryzacji metody real-time PCR (RQ-PCR) dla badania chimeryzmu po allo-przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, z zastosowaniem starterów i sond dla biallelicznych polimorfizmów typu insercja/delecja oraz delecja genu. Czulość RQ-PCR wynosiła 0,05% chimeryzmu mieszanego, a informatywność 100% (24/24) dla niespokrewnionych i 91,08% (51/56) dla spokrewnionych par dawca/biorca. Badania porównawcze z rutynowo stosowaną metodą STR-PCR wykonane dla 371 próbek DNA (236 z tego samego materiału, 135 z tego samego pobrania, lecz z innego materiału) wykazały, że: 1) wśród 260 próbek DNA z całkowitym chimeryzmem w STR-PCR 45% wyników RQ-PCR wskazywało na mieszany chimeryzm w zakresie od 72,8% do 99%; 2) wśród 95 próbek DNA z mieszanym chimeryzmem w STR-PCR korelacja z wynikami RQ-PCR wynosiła 91,14% dla tego samego materiału oraz 80,47% dla różnego materiału; 3) dla 13 z 17 próbek DNA, w których nie uzyskano amplifikacji w STR-PCR z powodu niskiego stężenia DNA (0,08–7,45 ng/μl), oznaczenie chimeryzmu RQ-PCR powiodło się. RQ-PCR jest czulszą niż STR-PCR metodą analizy chimeryzmu. Może być stosowana przy niskich stężeniach DNA, co daje możliwość badań chimeryzmu we wczesnym etapie po allo-HSCT oraz we frakcjach komórkowych.

SŁOWA KLUCZOWE: Chimeryzm po allo-HSCT – RQ-PCR – STR-PCR

SUMMARY

In this study, we report the standardization results of the real-time PCR method (RQ-PCR) for chimerism analysis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), using primers and probes specific for the insertion/deletion and null alleles polymorphisms. RQ-PCR assay sensitivity was calculated as 0,05% of mixed chimerism and informativeness as 100% (24/24) for nonrelated and 91,08% (51/56) for related donor/recipient HSCT pairs. Comparative studies with the routine STR-PCR method performed on 371 DNA samples (236 from the same material, 135 from the same donation, but different material) revealed that: 1) 45% of RQ-PCR results for 260 DNA

samples with complete chimerism in STR-PCR were reported as 72,8 – 99% mixed chimerism; 2) the correlation with the RQ-PCR results for 95 DNA samples with mixed chimerism in STR-PCR was 91,14% for the same and 80,47% for different material; 3) for 13 of 17 DNA samples with no amplification in STR-PCR due to low DNA concentration (0,08–7,45 ng/ μ l), RQ-PCR was successful. For chimerism analysis RQ-PCR is a more sensitive method than STR-PCR. It can be used at low DNA concentrations therefore creates better opportunity for chimerism analysis in the early post- allo-HSCT stage or in cell fractions.

KEY WORDS: Chimerism after allo-HSCT – RQ-PCR – STR-PCR

WSTĘP

Przeszczepienie allogenicznych komórek krwiotwórczych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*, allo-HSCT) prowadzi do powstania w organizmie biorcy zjawiska chimeryzmu hematopoetycznego. Badanie jego kinetyki ma istotne znaczenie kliniczne dla oceny ryzyka nawrotu choroby podstawowej, braku przyjęcia/odrzucenia przeszczepu oraz choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (*graft versus host disease*, GvHD), szczególnie w zabiegach transplantacji z niemieloablacyjnym postępowaniem przygotowawczym (*reduced intensity conditioning*, RIC) [1, 2, 3] i pozwala wcześniej wdrożyć procedury profilaktyczne lub terapeutyczne, między innymi przetoczenie limfocytów dawcy (*donor lymphocyte infusion*, DLI). Wiele publikacji wskazuje, że zastosowanie odpowiednio czułych metod oceny kinetyki chimeryzmu we wczesnym okresie po przeszczepieniu oraz we frakcjach komórek daje klinicytom dodatkowe informacje dotyczące przewidywania ryzyka w/w negatywnych komplikacji po allo-HSCT [2, 4, 5].

Rutynowo stosowane metody oceny chimeryzmu oparte są na technice FISH lub analizie polimorfizmów typu STR (*short tandem repeats*) lub VNTR (*variable number of tandem repeats*) [1, 2]. Te ostatnie mają wysoką informatywność, lecz niską czułość (1–5%). Metoda FISH ma wysoką czułość (0,1 – 0,001%), lecz może być zastosowana tylko do par dawca/ biorca różniących się płcią.

Spśród dostępnych obecnie metod największą czułość mają techniki RQ-PCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*) [2]. Najpowszechniej używana jest metodologia z sondami TaqMan [6, 7, 8] lub TaqMan MGB (*minor groove binding*) [9]. Opisano też pojedyncze doniesienia z zastosowaniem sond HybProbes (*hybridization probes*) [10] oraz z niespecyficznym znakowaniem ampikonów barwnikiem SYBR-Green [11].

Podstawą monitorowania chimeryzmu technikami RQ-PCR jest dobór markerów różnicujących biorcę i dawcę, zwykle z różnych *loci*: jednego obecnego u biorcy, a nie obecnego u dawcy i drugiego odwrotnie. Ich proporcje śledzi się w DNA chorego po allo-HSCT na podstawie wartości C_T dla każdej z reakcji PCR, odnosząc wyniki bezpośrednio do krzywych wzorcowych [8, 9] lub stosując wzory matematyczne ($\Delta\Delta C_T$, model Pfaffla), uwzględniające nachylenie krzywych wzorcowych, amplifikację genu kontrolnego oraz wartości C_T dla DNA kalibratora (wzorec 100% genotypu biorcy lub dawcy) [6, 10].

Najefektywniejszymi pod względem specyficzności i czułości (0,1 – 0,001%) markerami do oceny chimeryzmu metodą RQ-PCR są bialleliczne polimorfizmy typu insercja/delecja (ins/del) oraz allele *null* [6, 10, 11, 13, 14]. Trudniejsze w analizie RQ-PCR są polimorfizmy SNP (*single nucleotide polymorphism*). Ich wykrywanie wiąże się z niższą swoistością, z powodu występowania niespecyficznego amplifikacji z alternatywnego allelu [8, 9, 15], co obniża czułość oznaczeń markerów chimeryzmu do poziomu 1–0,1%.

Obecna praca stanowi prezentację wyników standaryzacji RQ-PCR z wykorzystaniem analizy polimorfizmów typu ins/del dla badań chimeryzmu po allo-HSCT. Celem badań była ocena czułości, powtarzalności i informatywności RQ-PCR oraz porównanie jej wyników z rutynowo używaną metodą fluorescencyjnej STR-PCR.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do oceny czułości i powtarzalności RQ-PCR był DNA mononuklearów (*mononuclear cells*, MNC) od 54 zdrowych dawców krwi. Służył on też jako tzw. DNA kalibratora w analizie chimeryzmu po allo-HSCT.

Informatywność RQ-PCR oszacowano analizując możliwość zróżnicowania 80 par biorca/dawca, poddanych allo-HSCT w latach 2003–2009 w dwóch ośrodkach: 68 w Klinice Przeszczepiania Komórek Krwiotwórczych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (różne choroby rozrostowe układu krwiotwórczego lub chłonnego); 12 w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii II Katedry Pediatrii, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (dzieci z ostrą białaczką szpikową). W 24 przypadkach dawca był niespokrewniony z biorcą (21/68 oraz 3/12 z w/w ośrodków). Materiałem do badań przed allo-HSCT był DNA z krwi biorcy i dawcy, przy czym w jednym przypadku badano dwóch dawców, z powodu drugiego przeszczepienia.

Dla porównania RQ-PCR z STR-PCR zbadano 371 próbek DNA po allo-HSCT: 236 izolowano z tego samego materiału (146 z krwi, 10 ze szpiku, 84 z MNC), zaś 135 z tego samego pobrania, ale z krwi do STR-PCR, a z MNC do RQ-PCR. Z pierwszego ośrodka pochodziło 192 próbek DNA (z 5, 10, 15, 20, 25, 30 doby po HSCT), w tym wszystkie DNA z różnego materiału, a z drugiego – 179 próbek, zebranych po 30 dniu od HSCT.

DNA z 200 µl krwi lub szpiku, pobranych na EDTA oraz z frakcji MNC, uzyskiwanej w wyniku wirowania 10 ml krwi w gradiencie fikolu (Lymphoprep), izolowano za pomocą zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

RQ-PCR

Analizowano 25 markerów: 10 biallelicznych polimorfizmów ins/del (*ACE*, *RHC/c*, *S01*, *S04 – S11*) oraz 5 alleli *null* (*RHD*, *SRY*, *S03*, *S06*, *GSTMI*) [13, 16]. Genem kontrolnym dla badań po allo-HSCT został wybrany gen *CCR5*. Wszystkie reakcje prowadzono w 25 µl (12,5 µl buforu 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300/900 nM każdego z pary starterów i 150-200 nM sondy TaqMan). Do amplifikacji używano aparat ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) i uniwersalny profil temperaturowy: 2 min 50°C; 10 min 95°C; 45 cykli: 15s 95°C i 60s 60°C.

Standaryzacja każdej reakcji RQ-PCR polegała na wyznaczeniu krzywych czułości, tworzonych z serii 5-krotnych rozcieńczeń heterozygotycznego DNA z danym polimorfizmem – od 12500 do 4 kopii (100% – 0,05% chimeryzm) – w DNA homozygotycznym bez tego polimorfizmu (tzw. negatywny DNA), z zachowaniem końcowej koncentracji na poziomie 5ng/µl DNA (50 ng/reakcję). Powtarzalność krzywych czułości oszacowano poprzez 3-krotne badanie każdego rozcieńczenia DNA (powtarzalność wewnątrzeksperymentalna), w 3 różnych dniach (powtarzalność międzyeksperymentalna).

Dobór markerów różnicujących dawcę i biorcę przed przeszczepieniem w pierwszej kolejności zakładał analizę cech fenotypowych. Przy różnicach w płci czy fenotypie RhD lub RhC/c – markerami były: gen *SRY*, *RHD* lub allele *RHCE**C*/RHCE*c*. Jeśli to nie wystarczało, wykonywano RQ-PCR dla pozostałych polimorfizmów. W przypadkach zidentyfikowania kilku – wybierano te o jak najbardziej zbliżonej wydajności RQ-PCR, wyznaczonej z linii regresji krzywych standardowych. Preferowano informatywne polimorfizmy heterozygotyczne, a jeśli zachodziła konieczność użycia polimorfizmu homozygotycznego, tworzono indywidualną krzywą czułości z serii rozcieńczeń homozygotycznego DNA. Przy wyborze markera delecji genu (z wyjątkiem *SRY*), oceniano jego dozę (zygotyczność), poprzez współamplifikowanie genu *CCR5* i odnoszenie wyniku do proporcji u homozygot i heterozygot.

Analiza chimeryzmu u biorcy po allo-HSCT opierała się na wykonaniu trzech reakcji RQ-PCR (każda w 2 powtórzeniach) dla: 1) polimorfizmu biorcy; 2) polimorfizmu dawcy; 3) genu *CCR5*. Badano stałą ilość DNA (50 ng), ustaloną spektrofotometrycznie lub wg wykrytej ilości genu *CCR5* w RQ-PCR. Jako kontrolę pozytywną i punkt odniesienia w analizie matematycznej wyniku, badano DNA

kalibratora, który pod względem analizowanych markerów miał jednocześnie taki sam genotyp jak dawca i biorca przed przeszczepieniem.

Do obliczania odsetka genotypu biorcy i dawcy (dla każdego markera osobno) korzystano ze wzoru Pfaffla, biorącego po uwagę wartości C_T reakcji RQ-PCR dla DNA badanego i DNA kalibratora oraz nachylenie krzywych wzorcowych używanych w RQ-PCR:

$$\% \text{ genotypu dawcy/biorcy} = 100 \cdot (E_{\text{target}})^{\Delta C_{T \text{ target}} (C - U)} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T \text{ ref}} (C - U)}$$

gdzie: $E_{\text{target}} = 10^{(-1/\text{nachylenie krzywej czułości PCR markera})}$ – efektywność RQ-PCR markera
 $E_{\text{ref}} = 10^{(-1/\text{nachylenie krzywej czułości PCR genu } CCR5)}$ – efektywność RQ-PCR *CCR5*
 C = (wartość C_t markera biorcy/dawcy lub genu *CCR5* dla DNA kalibratora)
 U = (wartość C_t markera biorcy/dawcy lub genu *CCR5* dla DNA chorego)

Jeśli udział któregoś z genotypów był $\leq 10\%$, udział drugiego obliczano przez odjęcie tej wartości od 100%; jeśli był $> 10\%$, obie wartości sumowano i traktowano jako 100%, a genotypy dawcy i biorcy obliczano przez proporcję. Ostatecznie wynik mieszanego chimeryzmu podawano jako odsetek genotypu dawcy.

STR-PCR

Fluorescencyjna STR-PCR wykonywana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN (IGCz) obejmowała analizę 8 *loci*: *FGA*, *F13A1*, *TH01*, *VWA*, *D21S11*, *D12S391*, *FES*, *D8S1179* [16]. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w sekwenatorze ALFexpress (Pharmacia Biotech). W Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (IHIT) używano zestaw AmpFISTR SGM Plus (Applied Biosystems), obejmujący 10 *loci* STR i amelogeninę oraz aparat ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

ANALIZA STATYSTYCZNA

Do statystycznej charakterystyki krzywych czułości reakcji RQ-PCR oraz badań porównawczych z STR-PCR, zastosowano analizę regresji, wyznaczającą wartości współczynników korelacji R^2 . Zmienność wewnątrz- i międzyeksperymentalną obliczano poprzez wyznaczenie wartości odchyłeń standardowych i współczynników powtarzalności CV, zgodnie z pracą Jimenez-Velasco i wsp. [10].

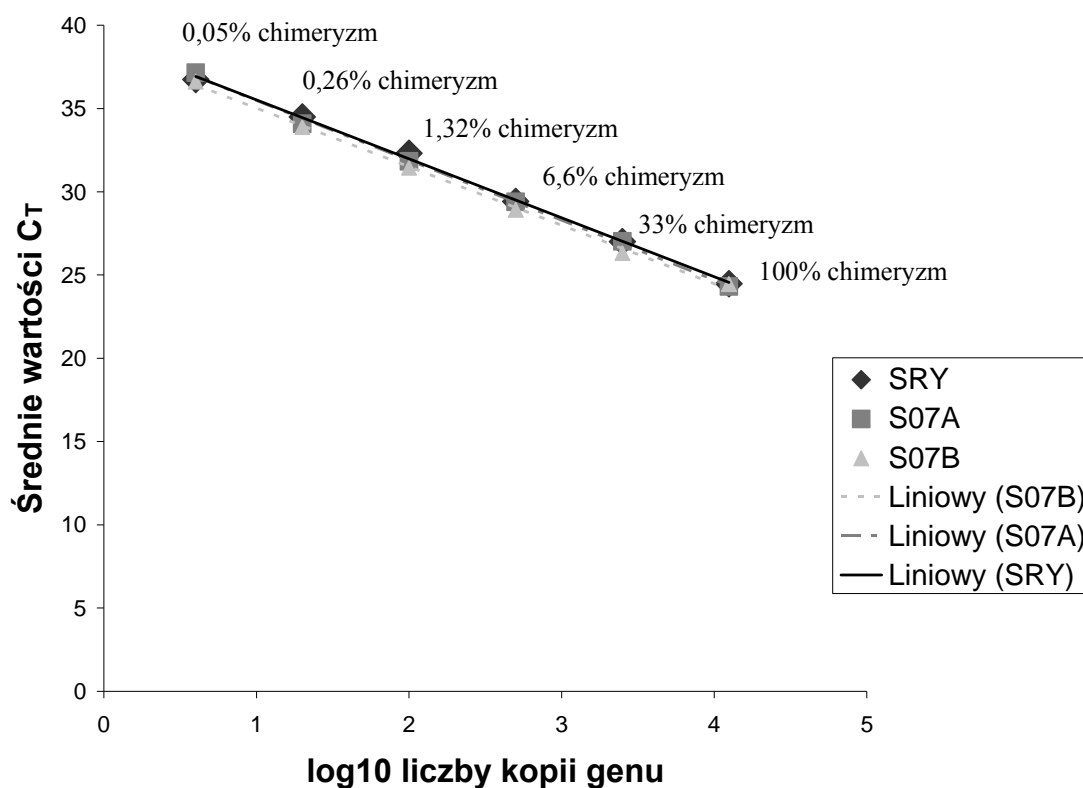
WYNIKI

Czułość, powtarzalność i informatywność RQ-PCR

Czułość eksperymentalna wszystkich reakcji RQ-PCR wynosiła 4 kopie (5×10^{-4}), co odpowiada wykrywaniu 0,05% mieszanego chimeryzmu. Dla porównania czułość metody STR-PCR stosowanej w IGCz określono na 1–5%, a w IHIT na 5%.

Wyznaczone z linii regresji współczynniki korelacji krzywych czułości RQ-PCR mieściły się w granicach: 0,911–0,999, a teoretyczne wartości C_T dla wykrywania 1 kopii badanych polimorfizmów (0,013% chimeryzm) pomiędzy 37,328 a 41,081. Nachylenie krzywych regresji, charakteryzujące efektywność reakcji RQ-PCR, wahały się od –3,191 do –4,198. Do wzoru Pfaffla wstawiano uśrednione wartości nachyleń krzywych, wyznaczone w 3 eksperymentach. Przykładowe, krzywe czułości dla najczęściej używanych markerów *SRY*, *S07A* i *S07B* przedstawiono na Rycinie 1.

Wyniki analizy statystycznej powtarzalności wyników badań standaryzacyjnych RQ-PCR przedstawiono w Tabeli 1.



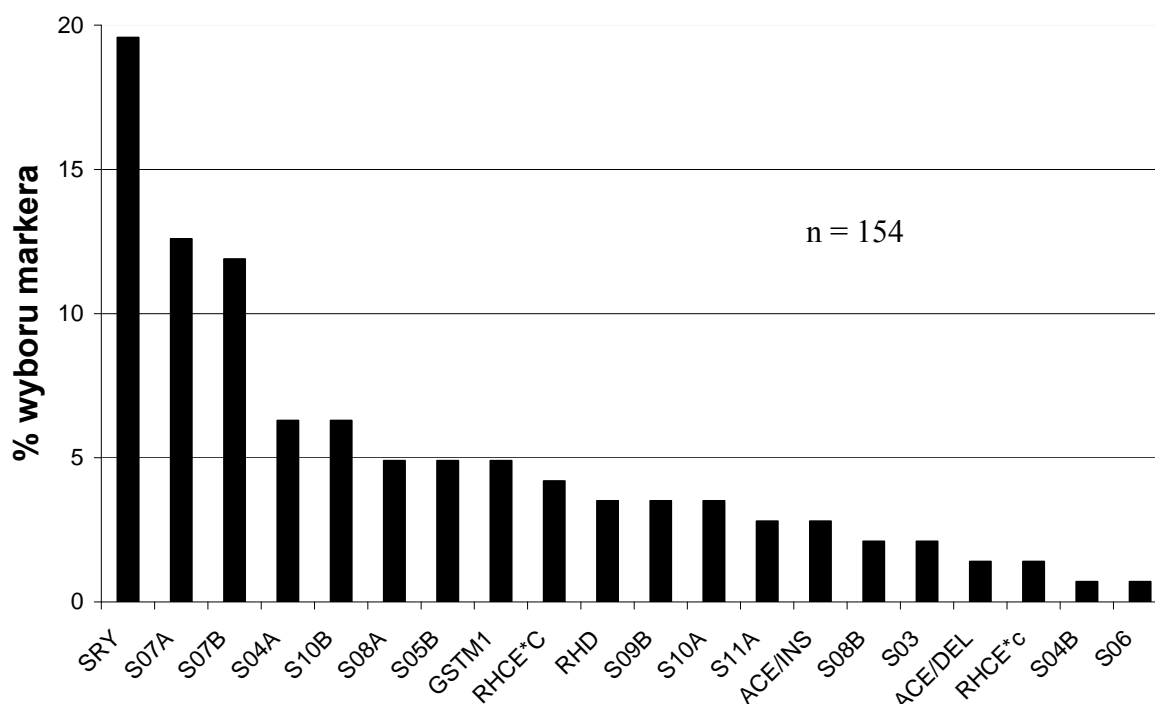
Ryc. 1. Krzywe czułości markerów *SRY*, *S07A* i *S07B*
 Fig. 1. Calibration curves for *SRY*, *S07A* and *S07B* markers

Tabela 1. Wyniki powtarzalności wewnątrz- i międzyeksperymentalnego badania markerów *SRY*, *S07A* i *S07B* metodą RQ-PCR

Table 1. Intra and inter-assay variability of the *SRY*, *S07A* and *S07B* markers analyzed by RQ-PCR

Marker	Powtarzalność (variability)					
	wewnątrzeksperymentalna inter-assay			międzyeksperymentalna intra-assay		
	Zakres C_T	SD	CV	Zakres C_T	SD	CV
SRY	23,83 – 35,99	0,09 – 0,48	0,33 – 1,40	24,48 – 36,74	0,74 – 0,98	2,23 – 3,26
S07A	24,17 – 37,42	0,07 – 0,87	0,24 – 1,42	24,31 – 37,15	0,24 – 0,57	1,00 – 1,54
S07B	23,94 – 36,03	0,08 – 0,42	0,26 – 1,16	24,45 – 36,62	0,43 – 0,91	1,77 – 2,86

Protokół RQ-PCR różnicował 100% (24/24) niespokrewnionych i 91,08% (51/56) spokrewnionych par dawca/biorca allo-HSCT. Pozostałe 5 par odrzucono z analizy chimeryzmu, gdyż znaleziono jedynie marker/y dla dawcy (wyjaśnienie w dyskusji). W prezentowanych badaniach zarówno dla par niespokrewnionych jak i dla par spokrewnionych informatywność metody STR-PCR w obu ośrodkach wynosiła 100%.



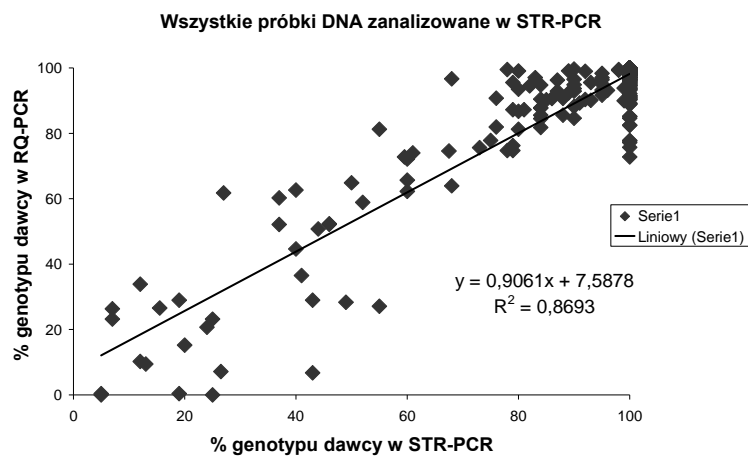
Ryc. 2. Rozkład częstości wybieranych markerów u dawców i biorców allo-HSCT
Fig. 2. Frequency distribution of selected markers for allo-HSCT donors and recipients.

Na Rycinie 2 przedstawiono przydatność poszczególnych informatywnych markerów. Najczęściej wybierano gen *SRY* z chromosomu Y, potem polimorfizmy *S07A* lub/i *S07B* z chromosomu X, a pozostałe były wykorzystane z mniejszą częstością, zgodnie z ich rozkładem w populacjach kaukaskich [6]. Typowanie markerów u 54 dawców krwi zaowocowało wyszukaniem 6 osób heterozygotycznych w większości polimorfizmów, których DNA wykorzystano jako kalibratory DNA dla analizy chimeryzmu u 96,4% chorych, przy czym w 85% przypadków korzystano z DNA jedynie 3 dawców.

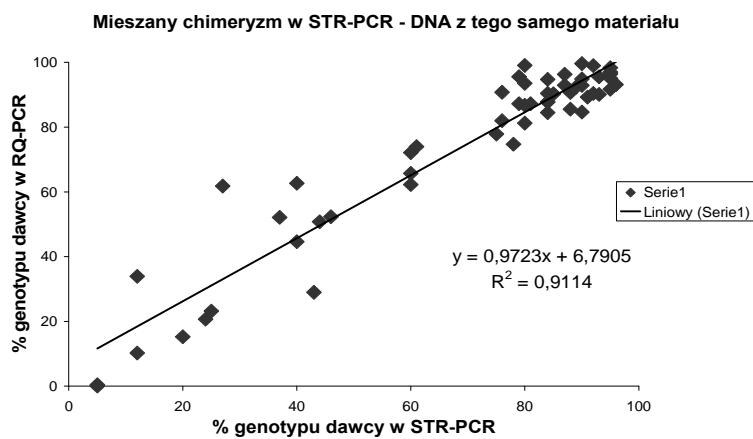
Analiza porównawcza RQ-PCR i STR-PCR

Współczynnik korelacji wszystkich wyników RQ-PCR i STR-PCR, które udało się zamplikować w STR-PCR (354/371 próbek), wynosił 0,8693 (Rycina 3a). Wśród 260 próbek DNA oznaczonych w STR-PCR jako chimeryzm całkowity (CC), wyniki chimeryzmu RQ-PCR mieściły się w zakresie od 72,8% do 100% genotypu dawcy, z 45% wyników poniżej 99%. Korelacja wyników przy mieszanym chimeryzmie (MC) w STR-PCR była wyższa dla jednorodnego (Rycina 3b; $R^2 = 0,9114$) niż dla różnorodnego materiału (Rycina 3c, $R^2 = 0,8047$). Dla 17/371 próbek DNA nie uzyskano amplifikacji w STR-PCR, zaś u 13 z nich badanie chimeryzmu RQ-PCR powiodło się, mimo niskiego stężenia DNA (0,08 – 7,45ng/ μ l).

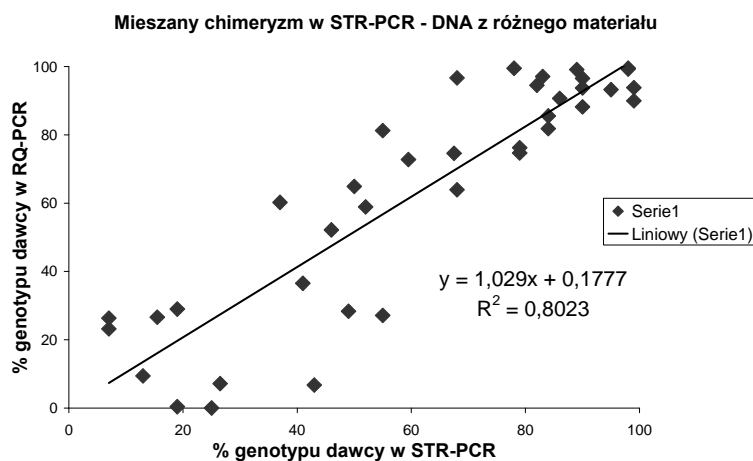
a)



b)



c)



Ryc. 3. Korelacja wyników RQ-PCR z STR-PCR
Fig. 3. Correlation of RQ-PCR and STR-PCR results

DYSKUSJA

Prezentowana metoda badania chimeryzmu RQ-PCR z analizą polimorfizmów ins/del i alleli *null* to modyfikacja metodyki Alizadeha i wsp. [6]. Istotnymi zmianami było: 1/ poszerzenie listy markerów, 2/ wybranie precyzyjniejszego sposobu obliczeń (zamiast formuły $\Delta\Delta Ct$ – wzór Pfaffla, uwzględniający dodatkowo efektywność RQ-PCR dla genu kontrolnego), 3/ używanie DNA od dawców krwi do tworzenia krzywych czułości i jako kalibratory DNA we właściwej analizie chimeryzmu po allo-HSCT.

Badania standaryzacyjne RQ-PCR wykazały czułość wykrywania 0,05% (5×10^{-4}) mieszanego chimeryzmu, co stanowi 20–100-krotnie czulsze narzędzie niż rutynowo używane metody fluorescencyjnej STR-PCR o czułości 1–5% [16]. Mimo, że publikowano doniesienia, gdzie RQ-PCR z analizą polimorfizmów ins/del miały wyższą czułość (0,01–0,001% MC) [6, 10], to wynikała ona z faktu badania większego stężenia DNA. Nasz protokół został opracowany dla potrzeb badania kinetyki wczesnego chimeryzmu w MNC oraz frakcjach limfocytów, kiedy niemożliwe jest pozyskanie większych objętości materiału, szczególnie w 5, 10 dobie po allo-HSCT. Z drugiej strony taka czułość jest wystarczająca dla obserwowania zjawiska progresywnego mieszanego chimeryzmu poniżej proggu czułości STR-PCR [6, 7, 10]. Jest też znacząco wyższa niż RQ-PCR z analizą polimorfizmów SNP, gdzie z powodu niespecyficznego amplifikacji z alternatywnego allelu, czułość oznaczeń chimeryzmu mieszanego obniżona jest do poziomu 1–0,1% [8, 9, 15].

Analiza wewnątrz- i międzyeksperymentalnej powtarzalności wyników dowiodła wysokiej stabilności reakcji RQ-PCR.

Krzywe standardowe, których wartości nachylenia wstawiano do wzoru obliczającego odsetek genotypu dawcy lub biorcy po przeszczepieniu, były dla większości markerów molekularnych przygotowywane z serii rozcieńczeń DNA dawców krwi, heterozygotycznych w wielu *loci* i tak dobieranych, by sporządzenie dwóch krzywych dla śledzenia markera biorcy i dawcy u konkretnego chorego opierało się na badaniu tego samego DNA, a nie na badaniu dwóch serii mieszanin DNA dawcy i biorcy przed allo-HSCT, jak to robili inni autorzy [6, 7, 12]. Dodatkowo taka próbka DNA służyła jako kalibrator DNA w oznaczaniu chimeryzmu po allo-HSCT. Podobne podejście zastosowało też jedno laboratorium [15] podkreślając, że taka procedura eliminuje błędy sporządzania krzywych czułości z użyciem dwóch różnych próbek DNA, w tym DNA chorego sprzed allo-HSCT, którego jakość, stężenie i ilość często jest niezadowalająca. Dodatkowo używanie jako kalibratora DNA dawcy (zawsze tego samego, odpowiednio przygotowanego i przechowywanego w stabilnych warunkach) jest bardzo ważne dla perspektywnego monitorowania chimeryzmu u pacjentów i wprowadza element ujednoczenia procedury dla różnych pacjentów, ze względu na „uniwersalny genotyp” niektórych kalibratorów DNA (u 85% pacjentów korzystano z DNA tylko 3 dawców). Jedynie w sytuacji gdyby zachodziła konieczność badania przeciwstawnych cech homozygotycznych z tego samego *locus*, to należałoby badać dwa kalibratory DNA od osób o odpowiednich genotypach.

Niedogodnością badania chimeryzmu prezentowaną techniką RQ-PCR jest konieczność dokonania standaryzacji RQ-PCR dla szerokiego panelu polimorfizmów, by umożliwić wybór markerów różnicujących każdą parę dawca/biorca, co wiąże się z wysokimi kosztami. W naszych badaniach używaliśmy szerszego panelu markerów niż Alizadeh i wsp. oraz inni autorzy, stosujący technikę RQ-PCR (25 z 15 *loci* vs maksymalnie 19 z 11 *loci*). Dzięki temu informatywność naszej metody była wyższa (91,08%, a nie jak u innych 80–90%) [6, 10, 15]. Tym nie mniej informatywność naszego protokołu RQ-PCR nie dorównała informatywności metod opartych na STR-PCR, która na ogół jest bliska lub równa 100%. Należy podkreślić, że przeprowadzona przez nas analiza informatywności RQ-PCR była bardzo restrykcyjna. Wykluczaliśmy z badań tą techniką 5 par, u których znaleziono jedynie marker/y dla dawcy. Wiadomo bowiem, że RQ-PCR charakteryzuje się dużą precyzją przy oznaczaniu udziału DNA biorcy/dawcy poniżej 5% [15], 10% [12], a nawet 30% [10], natomiast niską precyzją przy proporcjach >50% [10, 15]. Dlatego wskazana jest równoległa analiza zarówno markera biorcy, jak i dawcy. W sytuacji braku markera dla dawcy, można badać sam marker biorcy, bo powinien on szybko zanikać

po przeszczepieniu. Nie jest zalecane monitorowanie chimeryzmu wyłącznie w oparciu o analizę markera dawcy, bo błąd metody dla dużych proporcji DNA dawcy sprawia, że bez konfrontacji z pojawieniem się markera dla biorcy, można przeoczyć spadek odsetka komórek dawcy.

Badania porównawcze wyników oznaczania chimeryzmu RQ-PCR i STR-PCR wykazały zadawalającą korelację, szczególnie dla tego samego materiału. Niższy współczynnik korelacji dla różnorodnego materiału mógł wynikać nie tyle z błędu którejś metody, ale z różnicy w proporcji DNA biorcy do DNA dawcy we krwi (STR-PCR) i we frakcji MNC (RQ-PCR) na tak wczesnym etapie po allo-HSCT, na jakim ten materiał pobrano (5–30 dzień). Kinetyka chimeryzmu jest wtedy różna dla różnych linii komórkowych [4, 5]. Należy też pamiętać o niższej precyzji STR-PCR dla proporcji DNA biorcy/dawcy na progu czułości metody, a w przypadku RQ-PCR dla wartości pomiędzy 30–100%. Zaletą RQ-PCR w stosunku do STR-PCR jest za to niewątpliwie jej czułość w przypadkach niskiej koncentracji DNA, co umożliwia zastosowanie RQ-PCR dla badania chimeryzmu u pacjentów z bardzo słabą odnową hematologiczną, szczególnie na wczesnym etapie od przeszczepienia oraz dla badania frakcji komórkowych.

W podsumowaniu oceny naszego protokołu RQ-PCR w porównaniu z STR-PCR, jeszcze raz chcemy podkreślić zalety metody – wysoką czułość i precyzyjność, widząc jednocześnie potrzebę poszerzenia listy markerów dla zwiększenia jej informatywności.

Praca w części finansowana z grantu zamawianego PBZ-KBN-120/P05/2004

PIŚMIENNICTWO

1. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*, 2005; **35**(2): 107-19.
2. Dawidowska M, Guz K, Brojer E, Wachowiak J, Witt M. Chimeryzm po allogenicznej transplantacji macierzystych komórek krwiotwórczych. *Hematologia molekularna patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze*. Red. Witt M, Szczepański T, Dawidowska M. Ośrodek Wyd. Nauk. 2009; 177-94.
3. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2004; **112**(1-2): 16-23.
4. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G i wsp. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; **13**(12): 2059, 2060-9.
5. Miura Y, Tanaka J, Toubai T i wsp. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; **37**(9): 837-43.
6. Alizadeh M, Bernard M, Danic B. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; **99**(12): 4618 – 25.
7. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. 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.
8. Maas F, Schaap N, Kolen S i wsp. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003; **17**(3): 630-633.
9. Harries L, Wickham WCL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction." *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**(3): 283-290.
10. Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J i wsp. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 2005; **19**(3): 336-343.
11. Bai, L, Deng YM, Dodds AJ, Milliken S, Moore J, Ma DD. A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients. *Eur J Haematol* 2006; **77**(5): 425-431.
12. Masmans T N, Madsen HO, Petersen SL i wsp. Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; **11**(7): 558-566.
13. Brojer E, Żupańska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; **45**: 1473-1480.

14. Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000; **46**: 1301 – 1309.
15. Willasch A, Schneider G, Reincke BS i wsp. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement. *Lab Hematol* 2007; **13**(3): 73-84.
16. Dawidowska M, Jółkowska-Baraniak J, Guz K i wsp. Analiza chimeryzmu poprzyszczepowego metodą STR-PCR i RQ-PCR. *Hematologia molekularna patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze*. Red. Witt M, Szczepański T, Dawidowska M. Ośrodek Wyd. Nauk. 2009, 239-252.

Praca wpłynęła do Redakcji 27.04.2010 r. i została zakwalifikowana do druku 24.05.2010 r.

Adres Autora:

Dr n. przyr. Katarzyna Guz
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Indiry Gandhi 14
02-776 Warszawa
tel. (22) 34-96-600, wew. 144, 154
e-mail: kguz@ihit.waw.pl