

**Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski**

---

**SYLWIA CZEKALSKA**

**Badanie chimeryzmu hemopoezy u chorych z białaczkami  
poddanych allogenicznej transplantacji komórek  
macierzystych**

*Praca doktorska*

Promotor: **Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki**

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Aleksander B. Skotnicki

KRAKÓW 2007

---

*Składam podziękowania Promotorowi niniejszej pracy doktorskiej  
**Panu Prof. dr hab. n. med. Aleksandrowi B. Skotnickiemu** za wybór ciekawego tematu,  
wszechstronną pomoc, naukowe kierownictwo i ogromną życzliwość.  
Składam również podziękowania **Panu Dr n. med. Tomaszowi Sasze**  
za nieocenioną pomoc i wspieranie mnie swoją wiedzą oraz  
cenne uwagi, które doprowadziły prezentowaną pracę do obecnego kształtu.  
Dziękuję moim **Współpracownikom**, którzy zawsze wspierali mnie  
pomocną dłonią i dobrym słowem.  
Ponadto gorąco dziękuję mojej **Rodzinie** za nieustanne wsparcie,  
wyrozumiałość i cierpliwość.*

---

# SPIS TREŚCI

|   |    |
|---|----|
| <b>Wykaz skrótów stosowanych w pracy</b> .....  | 7  |
| <b>Streszczenie</b> .....   | 8  |
| <b>Summary</b> .....  | 10 |
| <b>Rozdział 1. Wstęp</b> .....  | 11 |
| <b>1.1. Wybrane zagadnienia z fizjologii hematopoezy</b> .....                              | 11 |
| <b>1.1.1 Historyczne i współczesne spojrzenie na hematopoezę</b> .....                      | 11 |
| <b>1.1.2 Charakterystyka macierzystej komórki hematopoetycznej</b> .....                    | 11 |
| <b>1.2 Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych</b> .....        | 14 |
| <b>1.2.1 Wskazania do alloSCT</b> .....   | 14 |
| <b>1.2.2 Uwarunkowanie przeszczepienia (kondycjonowanie)</b> .....                          | 15 |
| <b>1.2.3 Źródła materiału przeszczepowego</b> .....   | 16 |
| <b>1.3. Choroba GvH i efekt GvL</b> .....   | 17 |
| <b>1.3.1 Choroba GvH</b> .....  | 17 |
| <b>1.3.2 Efekt GvL</b> .....  | 18 |
| <b>1.4 Chimeryzm hematopoetyczny</b> .....  | 19 |
| <b>1.5 Metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego</b> .....                                  | 21 |
| <b>Rozdział 2. Cele pracy</b> .....   | 26 |
| <b>Rozdział 3. Materiał i metody</b> .....  | 27 |
| <b>3.1 Grupa badana</b> .....   | 27 |
| <b>3.1.1 Liczebność i charakterystyka badanej grupy</b> .....                               | 27 |
| <b>3.2 Narzędzia badawcze</b> .....   | 29 |
| <b>3.2.1 Odczynniki</b> .....   | 29 |
| <b>3.2.2 Aparatura</b> .....  | 30 |
| <b>3.2.3 Programy komputerowe</b> .....   | 31 |
| <b>3.2.4 Bazy danych</b> .....  | 31 |
| <b>3.3 Metody</b> .....   | 31 |
| <b>3.3.1 Postępowanie z materiałem biologicznym przed allogeniczną transplantacją</b> ..... | 31 |
| <b>3.3.2 Postępowanie z materiałem biologicznym po allogenicznej transplantacji</b> .....   | 31 |
| <b>3.3.3 Częstotliwość monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego</b> .....                 | 32 |
| <b>3.3.4 Izolacja komórek jednojądrzastych (MNC) ze szpiku lub krwi obwodowej</b> .....     | 32 |

|                    |  |           |
|--------------------|--|-----------|
| 3.3.5              | Separacja subpopulacji limfocytów T .....  | 32        |
| 3.3.6              | Izolacja materiału genetycznego .....  | 33        |
| 3.3.7              | Pomiar ilości materiału genetycznego .....   | 33        |
| 3.3.8              | Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR) .....  | 33        |
| 3.3.9              | Ocena chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy metody<br>STR-PCR .....                 | 35        |
| 3.3.10             | Analiza długości fragmentów .....  | 36        |
| 3.3.11             | Kontrola poprawności izolacji DNA .....  | 36        |
| 3.3.12             | Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym .....                                     | 37        |
| 3.3.13             | Reguły matematyczne stosowane do oceny chimeryzmu metodą<br>STR-PCR .....              | 37        |
| 3.3.14             | Ustalenie profilu genetycznego dla metody RQ-PCR .....                                 | 38        |
| 3.3.15             | Ocena chimeryzmu metodą ilościowej reakcji PCR (RQ-PCR) .....                          | 39        |
| 3.3.16             | Reguły matematyczne stosowane do oceny chimeryzmu metodą<br>RQ-PCR .....               | 41        |
| <b>Rozdział 4.</b> | <b>Wyniki .....</b>  | <b>42</b> |
| 4.1                | Informatywność sekwencji STR o wysokim stopniu polimorfizmu .....                      | 42        |
| 4.2                | Częstotliwość informatywnych sekwencji STR o wysokim stopniu<br>polimorfizmu .....     | 42        |
| 4.3                | Wzory alleliczne uzyskiwane metodą STR-PCR .....                                       | 43        |
| 4.4                | Typy wzorów allelicznych uzyskiwanych przy pomocy metody RQ-PCR .....                  | 44        |
| 4.5                | Kontrola jakości DNA .....   | 45        |
| 4.6                | Informatywność sekwencji o dwuallelicznym polimorfizmie .....                          | 46        |
| 4.7                | Częstotliwość informatywnych sekwencji o dwuallelicznym<br>polimorfizmie .....         | 46        |
| 4.8                | Porównanie czułości reakcji STR-PCR i RQ-PCR .....                                     | 47        |
| 4.9                | Wczesna kinetyka chimeryzmu hematopoezy oceniana przy pomocy metody<br>STR-PCR .....   | 50        |
| 4.10               | Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i we krwi w 30 dobie po<br>transplantacji ..... | 51        |
| 4.11               | Wszczepienie molekularne .....   | 52        |
| 4.12               | Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej 30 doby po transplantacji.....             | 54        |
| 4.13               | Porównanie metod STR-PCR i RQ-PCR z innymi metodami laboratoryjnymi.....               | 55        |

|                    |   |           |
|--------------------|---|-----------|
| 4.14               | Przykłady kształtowania się chimeryzmu hematopoetycznego po allogeniczej transplantacji monitorowanego przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR ..... | 57        |
| 4.14.1             | Wpływ chemioterapii na zmiany chimeryzmu hemopoetycznego .....  | 57        |
| 4.14.2             | Powrót hematopoezy o genotypie biorcy bez towarzyszącego mu nawrotu choroby podstawowej .....   | 60        |
| 4.14.3             | Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjenta w remisji molekularnej   | 63        |
| 4.14.4             | Wpływ leczenia antyproliferacyjnego i immunosupresyjnego na zmiany chimeryzmu hematopoetycznego .....   | 68        |
| 4.14.5             | Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego ocenianego w szpiku i krwi obwodowej nie odzwierciedlają nawrotu pozaszpikowego .....                       | 71        |
| 4.14.6             | Wpływ infuzji limfocytów dawcy na kinetykę chimeryzmu w krwi i szpiku   | 72        |
| 4.14.7             | Monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji limfocytów T. ....  | 74        |
| 4.15               | Zmiany chimeryzmu hemopoetycznego a ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD) .....   | 76        |
| 4.16               | Mieszany chimeryzm hematopoetyczny jako docelowy efekt allogeniczej transplantacji .....  | 78        |
| <b>Rozdział 5.</b> | <b>Dyskusja .....</b>   | <b>80</b> |
| 5.1                | Wprowadzenie .....  | 80        |
| 5.2                | Metoda półilościowej oceny chimeryzmu hematopoetycznego (STR-PCR) - jej zalety i ograniczenia .....   | 81        |
| 5.3                | Chimeryzm hematopoetyczny.....  | 85        |
| 5.4                | Metoda ilościowej oceny chimeryzmu hematopoetycznego (RQ-PCR) - jej zalety i ograniczenia .....   | 86        |
| 5.5                | Porównanie metod STR-PCR i RQ-PCR .....   | 87        |
| 5.6                | Szpik kostny a krew obwodowa – znaczenie wyboru źródła komórek w ocenie chimeryzmu hematopoezy .....  | 89        |
| 5.7                | Wczesne zmiany chimeryzmu hematopoezy – wszczepienie molekularne .....  | 91        |
| 5.8                | Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego w późnym okresie potransplantacyjnym .....  | 94        |
| 5.8.1              | Analiza chimeryzmu u chorych z nienowotworowymi schorzeniami układu hematopoetycznego.....  | 95        |
| 5.8.2              | Analiza chimeryzmu u chorych z nowotworowymi schorzeniami układu krwiotwórczego .....   | 96        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 5.8.2.1 Znaczenie monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego – infuzja limfocytów dawcy (DLI) ..... | 96         |
| 5.8.2.2 Znaczenia monitorowania chimeryzmu hematopoezy w subpopulacjach komórkowych .....           | 98         |
| 5.8.2.3 Monitorowanie chimeryzmu hematopoezy a ocena choroby resztkowej .....                       | 100        |
| 5.8.2.4 Częstotliwość monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego.....                               | 103        |
| 5.8.2.5 Obraz chimeryzmu hematopoezy w czasie występowania GvHD i GvL .....                         | 104        |
| 5.8.2.6 Wpływ leczenia immunosupresyjnego na zmiany chimeryzmu hematopoezy.....                     | 106        |
| 5.8 Podsumowanie .....  | 106        |
| <b>Rozdział 6. Wnioski .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>Aneks Tabele .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>Spis tabel .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>Spis rycin .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>Bibliografia .....</b>   | <b>133</b> |

---

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- **ALL** – ostra białaczka limfoblastyczna
- **alloCBT** – allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych pochodzących z krwi pępowinowej
- **alloHSCT** – allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych poprzedzona kondycjonowaniem mieloablacyjnym
- **alloNMSCCT** – allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych poprzedzona kondycjonowaniem niemieloablacyjnym
- **alloSCT** – allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych
- **AML** – ostra białaczka szpikowa
- **CC** – całkowity chimeryzm
- **cDNA** – DNA komplementarny
- **CLL** – przewlekła białaczka limfatyczna
- **CML** – przewlekła białaczka szpikowa
- **Ct** – numer cyklu w którym po raz pierwszy obserwuje się logarytmiczny przyrost ilości produktu w reakcji RQ-PCR
- **DLI** – infuzja limfocytów dawcy
- **FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
- **GvHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
- **aGvHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi postać ostra
- **cGvHD** – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi postać przewlekła
- **GvL** – efekt przeszczep przeciwko białaczce
- **HLA** – główny układ zgodności tkankowej
- **IDCC** – dendritic sarkoma
- **MC** – mieszany chimeryzm
- **MDS** – zespół mielodysplastyczny
- **ME** – wszczepienie molekularne
- **MM** – szpiczak mnogi
- **OMF** - osteomielifibroza
- **PCR** – polimerazowa reakcja łańcuchowa
- **RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
- **RQ-PCR** – ilościowa polimerazowa reakcja łańcuchowa
- **RT-PCR** – polimerazowa reakcja łańcuchowa poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji
- **SAA** – ciężka anemia aplastyczna
- **SC** – chimeryzm rozszczepiony
- **STR** – krótkie powtórzenia tandemowe, mikrosatelitarny DNA
- **STR-PCR** – półilościowa polimerazowa reakcja łańcuchowa
- **TAE** – Tris-Acetate –EDTA
- **TBE** – Tris-Borate-EDTA
- **TBI** – napromienienie całego ciała
- **VNTR** – powtórzenia tandemowe o zmiennej długości, minisatelitarny DNA

---

## STRESZCZENIE

Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych (alloSCT) jest jednym ze sposobów leczenia nowotworowych schorzeń hematologicznych. Jednakże u około 30–50% pacjentów poddanych takiej terapii nie uzyskuje się pożądaných efektów. Przyczyn niepowodzenia należy upatrywać w odrzuceniu przeszczepu, pojawieniu się ciężkiej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) lub w nawrocie choroby nowotworowej. Po przeprowadzeniu allogenicznego przeszczepu dochodzi do osiedlania się komórek hematopoetycznych dawcy w niszach szpikowych biorcy, a efektem tego jest powstanie prawidłowego układu krwiotwórczego i immunologicznego o genotypie dawcy, czyli uzyskanie całkowitego chimeryzmu dawcy (CC). Początkowo w szpiku kostnym i we krwi obwodowej biorcy współistnieją jego własne komórki i komórki dawcy, a stan ten nosi nazwę mieszanego chimeryzmu hematopoetycznego (MC) i zazwyczaj jest etapem przejściowym na drodze do CC. Identyfikacja komórek pochodzących od dawcy i od biorcy umożliwia monitorowanie procesu wszczepienia oraz zmian chimeryzmu w późnym okresie potransplantacyjnym.

Badaniem objęto 38 osób z nowotworowymi i nienowotworowymi schorzeniami układu krwiotwórczego poddanych allogenicznej transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych wykonanej w Katedrze i Klinice Hematologii *Collegium Medicum* UJ w latach 2002-2004, u których wykonano łącznie 43 allogeniczne transplantacje.

Oznaczenia procentowego udziału komórek dawcy i biorcy w hematopoezie zachodzącej w organizmie biorcy były wykonywane dwiema odmiennymi metodami bazującymi na polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Metoda STR-PCR łączy w sobie etap amplifikacji niekodujących sekwencji DNA (STR – short tandem repeats) przeprowadzanej w czasie jakościowej reakcji PCR i analizę uzyskanego wyniku podczas rozdziału w sekwenatorze. Metodę STR-PCR zwykło się określać mianem metody półilościowej. Metoda RQ-PCR (metoda ilościowa) opiera się na amplifikacji w czasie rzeczywistym sekwencji charakteryzujących się dwuallelicznym polimorfizmem (insercje / delecje), co w praktyce przekłada się na dwie sytuacje: obecność lub brak pewnej niekodującej sekwencji DNA u danego człowieka.

Przebieg przyjmowania się przeszczepu u biorcy po wykonaniu allogenicznej transplantacji był monitorowany w następujących odstępach czasowych: przez pierwsze dwa tygodnie co drugi dzień, doba +21, +28, następnie co miesiąc do +180 doby, co 3 miesiące w pierwszym roku, a następnie co pół roku (łącznie 18 punktów czasowych).



---

Porównanie wybranych metod molekularnych przyniosło informację o większej czułości RQ-PCR. Jednak ze względu na brak istotnych różnic w wynikach otrzymanych przy pomocy obu metod oraz pracochłonność i koszt metody RQ-PCR jako metodę przydatną w praktyce klinicznej wybrano metodę STR-PCR. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego były zgodne z wynikami monitorowania choroby resztkowej prowadzonego przy pomocy metod molekularnych. Brak osiągnięcia całkowitego chimeryzmu dawcy lub jego utrata pozwalały na przewidzenie w większości przypadków nawrotu choroby. Badanie chimeryzmu hemopoetyki dostarczyło u 3 pacjentów informacji na podstawie których podjęto decyzję o zmianie leczenia (u 2 – przeprowadzenie infuzji limfocytów dawcy DLI wśród nich u 1 odstawiono immunosupresję i u 1 pacjentki podano G-CSF).

---

## SUMMARY

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) is a curative treatment for many patients suffering from malignant and non-malignant hematological disorders. Successful transplantation is a process that requires the engraftment of transplanted pluripotent hematopoietic stem cells which re-establish normal hematological and immunological systems. Distinguishing between host and donor origin of bone marrow and blood cells is vitally important for monitoring of the engraftment process. One of the most useful tool for engraftment monitoring is the assessment of hematopoietic chimerism, which occurs after alloHSCT and describes the percentage of donor hematopoietic and lymphoid cells in a transplant recipient.

Thirty eight adult patients, after alloSCT performed in Katedra i Klinika Hematologii *Collegium Medicum* UJ between 2002 and 2004 entered the study and the total number of transplantations was 43.

The evaluation of hematopoietic chimerism was based on PCR amplification of polymorphic non-coding DNA sequences - short tandem repeats (STR-PCR). The main tool was a semi-quantitative method – fragment length analysis. The product of amplification was analyzed using the sequencer. The second method was based on a quantitative Real Time PCR technique (RQ-PCR) based on SYBRgreen chemistry. There were performed amplification of biallelic non-coding DNA sequences with short insertions or deletions.

Hematopoietic chimerism evaluations were performed on +30, +60, +90, +120, +150, +180, +270 and +360 day post alloSCT on peripheral blood or bone marrow samples.

STR-PCR and RQ-PCR chimerism assays were compared and results evidenced the greater sensitivity of RQ-PCR method. There were not crucial differences in the results of chimerism evaluation obtained by means of these two methods. Considering the labour-consuming and the cost of the RQ-PCR the STR-PCR method was chosen as a very useful diagnostic tool. The analysis of chimerism kinetics after allogeneic stem cell transplantation allowed to modify the post-transplantation-treatment in 3 patients after alloNMSCT leading to increase of donor-origin hematopoiesis in transplant recipients (in 2 pts decision of DLI, 1 of them withdrawal of immunosuppression, 1 pt giving G-CSF). The results of chimerism monitoring confirmed that the failure of achieving a CC or lost of CC can predict the relapse of the disease.

---

# Rozdział 1

## WSTĘP

### 1.2. Wybrane zagadnienia z fizjologii hematopoezy

#### 1.2.4 Historyczne i współczesne spojrzenie na hematopoezę

Wielość funkcji krwi jako tkanki oraz morfologiczne i funkcjonalne zróżnicowanie jej poszczególnych składników komórkowych już w wieku XIX skłaniały badaczy do wyjaśnienia mechanizmu powstawania komórek krwi. Pierwsze teorie zakładały istnienie od trzech do jednej komórki pierwotnej dla wszystkich komórek krwi. Teorię trialistyczną reprezentował Schilling (1912), dualistyczną Ehrlich (1901), Turk (1905), i Naegeli (1908). Teoria unitarystyczna głoszona była już w wieku XIX przez Obraztsowa (1880), Irchowa (1891) i Pappenheima (1899) a następnie rozwijana przez Maksimowa (1902) i Ferratę (1936). Zwolennikiem ostatniej teorii był w Polsce profesor Julian Aleksandrowicz, jeden z prekursorów Krakowskiej Szkoły Hematologii. Badania naukowe rozpoczęte w latach 60 XX wieku dowiodły prawdziwości teorii unitarystycznej. Według współczesnego stanu wiedzy wszystkie komórki krwi pochodzą z jednej grupy komórek nazywanych macierzystymi komórkami hematopoetycznymi, które stanowią około 0,5-4% [1, 2] wszystkich komórek jądrzastych szpiku i około 0,01% jednojądrzastych komórek krwi obwodowej [1, 3].

#### 1.2.5 Charakterystyka macierzystej komórki hematopoetycznej

Wykazano, że w idealnych warunkach cały układ może zostać odtworzony nawet przez jedną hematopoetyczną komórkę macierzystą [4]. Główne cechy komórek macierzystych to zdolność do samoodnowy, proliferacji i do wielokierunkowego różnicowania w dojrzałe komórki potomne obecne we krwi obwodowej [1, 3].

Samoodnawianie polega na powstawaniu w następstwie podziału hematopoetycznej komórki macierzystej komórki identycznej jak komórka dzieląca się. Ta cecha komórek macierzystych jest niezbędna do podtrzymania istnienia układu krwiotwórczego i immunologicznego przez całe życie osobnika. Istnieją dane literaturowe według których pula

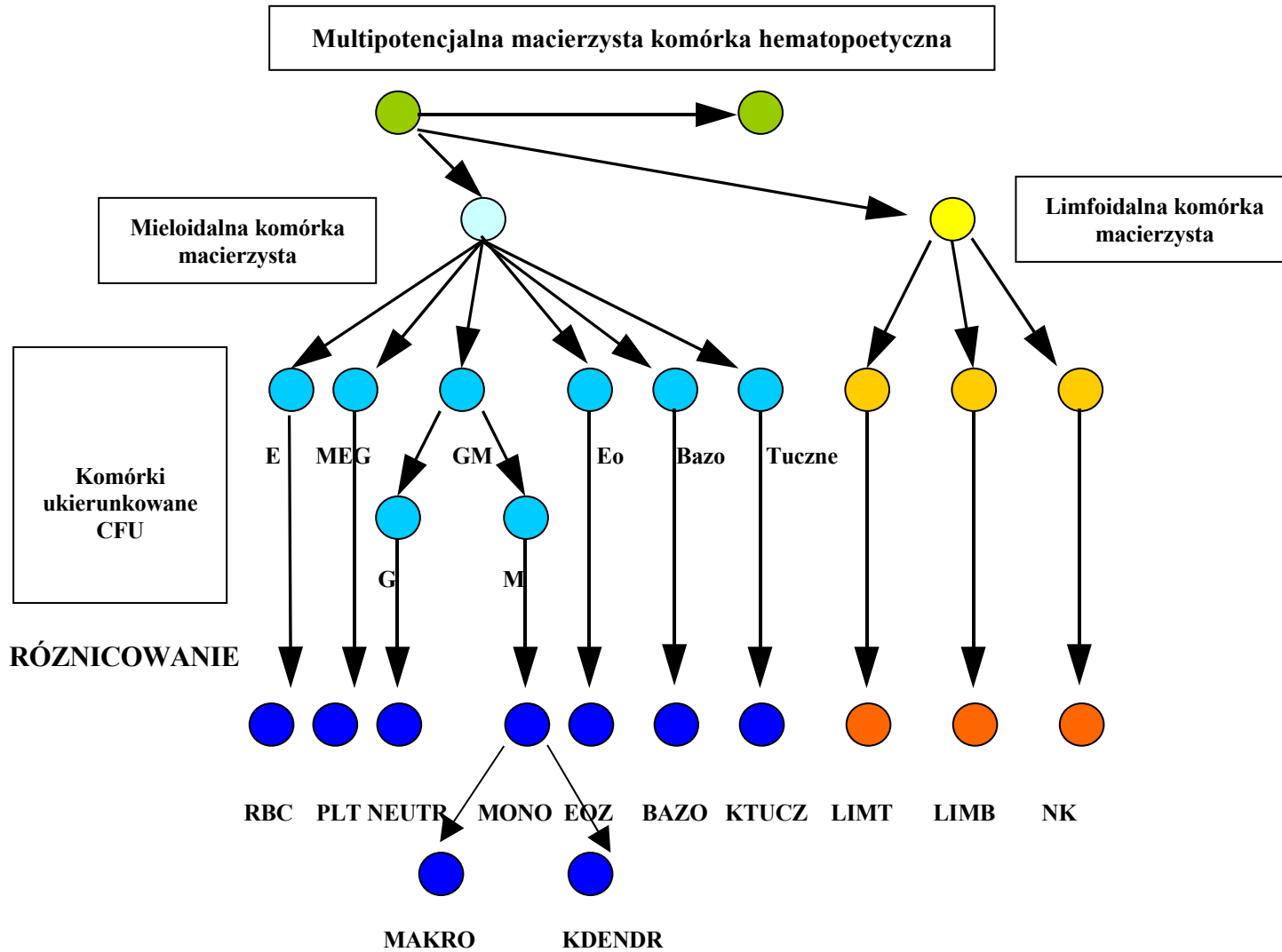
---

ludzkich hematopoetycznych komórek macierzystych starcza na 30-50 żyć [3] i to właśnie umożliwia odbudowę szpiku kostnego u innego osobnika poddanego allogenicznemu przeszczepieniu.

Drugą cechą hematopoetycznych komórek macierzystych jest ich zdolność do różnicowania się. W czasie tego procesu dochodzi do końcowego zróżnicowania komórek macierzystych i powstania komórek ukierunkowanych nazywanych również komórkami progenitorowymi. Komórki progenitorowe są komórkami niedojrzałymi i podczas kolejnych podziałów ulegają dojrzewaniu osiągając stadium komórek prekursorowych, które mają już pewne cechy charakterystyczne swoich komórek końcowych. Ostatecznie proces ten prowadzi do powstania 11 typów komórek dojrzałych, są to: erytrocyty, megakariocyty produkujące płytki krwi, granulocyty obojętnochłonne, granulocyty zasadochłonne, granulocyty kwasochłonne, monocyty (a następnie makrofagi), komórki tuczne, limfocyty T, limfocyty B, komórki NK i komórki dendrytyczne [1, 3, 5]. Całość procesu schematycznie przedstawiono na Rycinie 1.

Rycina 1. Schemat hematopoezy

**PROLIFERACJA**



Objaśnienie zastosowanych skrótów: **CFU** – komórki tworzące kolonie (z ang. *colony forming units*), **E** – kolonie erytroidalne, **MEG** – kolonie megakariocytowe, **G** – kolonie granulocytowe, **M** – kolonie makrofagowe, **GM** – kolonie granulocytowo-makrofagowe, **Eo** – komórki ukierunkowane do eozynofili, **Bazo** – komórki ukierunkowane do bazofili, **Tuczne** – komórki ukierunkowane do komórek tucznych, **RBC** – erytrocyty, **PLT** – płytki, **MONO** – monocyty, **MAKRO** – makrofagi, **KDENDR** – komórki dendrytyczne, **EOZ** – eozynofile, **BAZO** – bazofile, **KTUCZ** – komórki tuczne, **LIMT** – limfocyty T, **LIMB** – limfocyty B, **NK** – komórki NK.

---

Macierzysta komórka hematopoetyczna zbliżona jest wyglądem do małego limfocytu o gęstym skondensowanym jądrze i wąskim rąbku cytoplazmy. Immunofenotypowa charakterystyka hematopoetycznej komórki macierzystej przedstawia się następująco: CD34+, lin -, CD33-, Thy1+, CD71-, CD15-, CD38-, HLA-DR-, CD45RA low, c-kit R+. Najbardziej charakterystycznymi immunochemicznymi znacznikami aktywności komórek macierzystych są: słaba zdolność do gromadzenia barwnika fluorescencyjnego – rodaminy 123 oraz słaba retencja barwnika DNA Hoechst co świadczy o tym, że w stanie fizjologicznej równowagi ustroju znaczna większość komórek tej populacji znajduje się w fazie G0 cyklu komórkowego, czyli w fazie spoczynkowej [1, 2, 6, 7]. Do oceny populacji komórek macierzystych przed wykonaniem transplantacji stosuje się różne kombinacje wymienionych wyżej znaczników immunologicznych i immunochemicznych, jednak we wszystkich układach za najistotniejszą cechę uznaje się obecność na powierzchni molekuly CD34+, przy równoczesnym braku na powierzchni molekuł charakterystycznych dla komórek progenitorowych, prekursorowych i dojrzałych.

## **1.2. Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych**

Rozrostowe schorzenia układu krwiotwórczego stanowią około 10% wszystkich nowotworów. Stosowane leczenie ma na celu zmniejszenie liczby komórek klonu nowotworowego. Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych (alloSCT) jest aktualnie jedynym sposobem terapii dającym szansę trwałego wyleczenia szeregu nowotworowych i nienowotworowych schorzeń układu krwiotwórczego. Odsetek wyleczeń waha się w granicach 60 – 70% przypadków. Szansę na znalezienie zgodnego w układzie antygenów tkankowych HLA dawcy spokrewnionego lub niespokrewnionego posiada jedynie około 30% chorych [8 – 10]. Transplantacja allogeniczna obciążona jest ryzykiem 20-30% śmiertelności okołoprzeszczepowej [11].

### **1.2.1. Wskazania do alloSCT**

Od momentu wykonania pierwszej allogenicznej transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych (alloSCT) wskazania do przeszczepiania uległy rozszerzeniu. Przyczyną tego jest postęp dokonujący się w transplantologii hematologicznej i metodach laboratoryjnych służących diagnozowaniu oraz monitorowaniu chorego poddanego alloSCT, a także modyfikacja sposobów przeszczepiania, zmierzających do zmniejszenia zagrożeń związanych z

tym leczeniem jak i objęcia terapią chorych w starszym wieku i/lub gorszym stanie klinicznym (przeszczepienie poprzedzone kondycjonowaniem niemieloablacyjnym).

W Tabeli 1 zebrano obowiązujące obecnie wskazania do allogenicznej transplantacji.

**Tabela 1. Wskazania do alloSCT [4]**

| <b>NAJCZĘSTSZE WSKAZANIA</b>  | <b>RZADSZE WSKAZANIA</b>  | <b>WSKAZANIA INDYWIDUALNE</b>   |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ostra białaczka szpikowa – AML – 1 remisja</li> <li>• Przewlekła białaczka szpikowa – CML – faza przewlekła</li> <li>• Ostra białaczka limfoblastyczna u dorosłych – ALL – 1 remisja</li> <li>• Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci – ALL – 2 remisja</li> <li>• Ciężka niedokrwistość aplastyczna – SAA</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciężki skojarzony niedobór immunologiczny</li> <li>• Zespół Wiskott - Aldrich</li> <li>• Zespół Fanconiego</li> <li>• Zespół mielodysplastyczny</li> <li>• Talasemia (postać ciężka)</li> <li>• Zespół Hurlersa</li> <li>• Plazmocytoma</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa</li> <li>• Nocna napadowa hemoglobinuria</li> <li>• Przewlekła białaczka limfatyczna – CLL</li> <li>• Choroba Gauchera</li> <li>• Inne choroby spichrzeniowe i metaboliczne (np. leukodystrofia metachromatyczna itp)</li> <li>• Osteoporoza</li> </ul> |

### **1.2.2. Uwarunkowanie przeszczepienia (kondycjonowanie)**

Allogeniczna transplantacja, która jest wykonywana u pacjentów znajdujących się w remisji hematologicznej, jest zawsze poprzedzona chemioterapią warunkującą przyjęcie się przeszczepu (kondycjonowaniem). Wyróżnia się dwa typy kondycjonowania: mieloablacyjne i niemieloablacyjne.

W przypadku kondycjonowania mieloablacyjnego (alloHSCT) stosuje się radiochemioterapię (napromienienie całego ciała (TBI z ang. *Total Body Irradiation*) frakcjonowaną dawką 12 Gy) lub wyłącznie chemioterapię (np. busulfan). Kolejnym krokiem

---

jest podanie leku antyproliferacyjnego (cytostatyku), którym najczęściej jest cyklofosfamid. Kondycjonowanie mieloablacyjne stosuje się w celu eradykacji klonu białaczkowego, przygotowania w jamach szpikowych miejsca dla przeszczepianych komórek macierzystych oraz zapobieżenia odrzucenia przeszczepu poprzez wywołanie immunosupresji [3, 4, 12].

Zastosowanie kondycjonowania niemieloablacyjnego (alloNMSCT) ze względu na niższą toksyczność narządową rozszerza możliwości przeprowadzenia allogenicznej transplantacji u osób powyżej 50 roku życia, chorych z przeciwwskazaniami do transplantacji standardowej i pacjentów, u których już raz wykonano transplantację macierzystych komórek hematopoetycznych. Tego typu kondycjonowanie nie powoduje całkowitego zniszczenia komórek nowotworowych ani nie wywołuje nieodwracalnej aplazji szpiku kostnego. Jego zastosowanie ma na celu wywołanie w organizmie biorcy immunosupresji pozwalającej na osiągnięcie wszczepienia macierzystych komórek dawcy i wywołanie potencjalnie leczniczego efektu przeszczep przeciwko białaczce (GvL z ang. *Graft versus Leukemia*) [3, 13].

### **1.2.3. Źródła materiału przeszczepowego**

Pierwotnie źródłem hematopoetycznych komórek macierzystych był szpik kostny (alloBMT). W roku 1951 Brecher i Cronkit odkryli, że w krwi obwodowej krążą komórki hematopoetyczne. Wykorzystanie krwi jako źródła tych komórek stało się możliwe dopiero po odkryciu, iż zastosowanie czynników wzrostu i cytostatyków powoduje efektywny wzrost liczby komórek CD34+ na obwodzie (alloPBSCT). Rok 1960 przyniósł kolejne doniesienie dla transplantologii odkrycie, Boyse wykazał obecność komórek hematopoetycznych w krwi pępowinowej. Odkrycie to zaowocowało w 1988 pierwszą transplantacją komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (alloCBT). Według obowiązujących obecnie standardów minimalne ilości komórek zapewniające odbudowę układu krwiotwórczego i immunologicznego to w przypadku komórek jednojądrzastych  $2 \times 10^8$  na kilogram masy ciała biorcy natomiast w przypadku komórek CD34 pozytywnych to  $3 \times 10^6$  na kilogram masy ciała biorcy [3, 4, 14, 15].

## **1.3. Choroba GvH i efekt GvL**



---

### 1.3.1 Choroba GvH

Jednym z częstych powikłań w okresie poprzyszczepowym jest wystąpienie **choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi** (GvHD z ang. *Graft versus Host Disease*). Rozróżnia się dwa główne typy tego zjawiska do 100 doby po allogeniczej transplantacji jest to ostra postać (aGvHD z ang. *acute*) natomiast powyżej tej doby określana jest mianem przewlekłej (cGvHD z ang. *chronic*). Choroba ta jest związana z reakcją przeszczepionych alloreaktywnych limfocytów T CD8+ skierowaną przeciwko narządom i tkankom biorcy różniącym się od komórek dawcy w zakresie głównych lub mniejszych antygenów układu zgodności tkankowej HLA. Indukcja tej choroby wymaga prezentacji antygenów biorcy limfocytom T dawcy przez komórki dawcy prezentujące antygen [16, 17]. Dla wystąpienia choroby GvH niezbędne jest:

- przeprowadzenie allogeniczej transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych
- wywołanie w organizmie biorcy immunosupresji
- obecność w materiale przeszczepowym limfocytów T [18, 19]

Ze zjawiskiem GvHD łączy się wystąpienie zespołu wszczepiennego (z ang. *engraftment syndrome*), który, zwłaszcza u pacjentów poddanych kondycjonowaniu mieloabalcynemu, może poprzedzać wystąpienie GvHD [20].

Ostra postać GvHD jest traktowana jako dowód przyjęcia się przeszczepu, a moment pojawienia się aGvHD jest równoznaczny z momentem wszczepienia [4].

Forma przewlekła GvHD jest stanem dysregulacji immunologicznej powstającym między innymi w następstwie uszkodzenia przez alloreaktywne limfocyty T dawcy komórek nabłonka grasicy biorcy, co jest przyczyną upośledzenia jej funkcji endokrynej i zdolności do eliminacji autoreaktywnych limfocytów T na drodze apoptozy. Cechą charakterystyczną tej choroby jest nadmierna produkcja TNF, IFN $\gamma$  i IL-4, co prowadzi do zwiększonej proliferacji fibroblastów oraz zwiększonej produkcji kolagenu i autoprzeciwciał [4, 20].

Z chorobą GvH nierozzerwalnie jest związane bardzo istotne zjawisko jakim jest efekt **przeszczep przeciwko białaczce** (GvL z ang. *Graft versus Leukemia*) [19, 20].

### 1.3.2 Efekt GvL

---

Po raz pierwszy efekt GvL został opisany u ludzi w 1979 roku przez Weidena i wsp. [21]. Przyczyną tego zjawiska jest atak immunologicznych komórek dawcy przeszczepu (komórki NK, limfocyty T) skierowany przeciwko resztkowym komórkom białaczkowym. Limfocyty T oraz komórki NK reagują na antygeny specyficzne dla nowotworów, antygeny związane z nowotworami lub mniejsze antygeny układu zgodności tkankowej (mHAg z ang. *minor Histocompatibility Antigens*) [19, 22]. Właśnie to zjawisko leży u podłoża stwierdzenia, że allogeniczna transplantacja i infuzja limfocytów dawcy (DLI z ang. *Donor Lymphocyte Infusion*) są celowaną, leczniczą immunoterapią [4, 23, 24, 25].

Stwierdzono również, że brak wystąpienia efektu GvL jest równoznaczny z częstymi nawrotami choroby podstawowej (30-50%), tak dzieje się na przykład w syngenicznych przeszczepieniach lub w sytuacji gdy materiał przeszczepowy oczyszczono z limfocytów T (T-deplecja) [4, 19].

Komórki NK (NK z ang. *Natural Killers*) rozpoznają nowotworowe lub zmienione komórki na podstawie oddziaływań receptor – ligand. Na powierzchni komórek docelowych znajdują się molekuly aktywujące oddziaływanie komórek NK, a na komórkach NK receptory, takie jak: immunoglobulinopodobny receptor komórek NK (KIR), lektyna typu C oraz receptor naturalnej cytotoksyczności (NCR). Najważniejszym ligandem powierzchniowym komórek docelowych, który po połączeniu z receptorem hamuje cytotoksyczną reakcję komórek NK, jest antygen MHC klasy I, a szczególnie HLA–C [22]. Uważa się, że komórki NK mają zdolność do wywoływania efektu GvL bez towarzyszącej mu choroby GvH. To właśnie ta populacja komórek jest odpowiedzialna za wczesny efekt przeciwbiałaczkowy, a jej powolna odbudowa wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu [12].

Limfocyty T rozpoznają peptydy pochodzące z białek wewnątrzkomórkowych prezentowane na powierzchni komórek w kontekście cząsteczek MHC. Przeprowadzone badania dotyczące komórek T reagujących na antygeny specyficzne dla białaczek, dowodzą iż rozpoznają one nowe białka ulegające ekspresji w komórkach nowotworowych, powstające na skutek translokacji chromosomowej lub mutacji oraz w przypadku podwyższonej ekspresji prawidłowego białka prezentowane na powierzchni komórki w postaci peptydów. Takie unikalne peptydy zawierające mutację powstają, na przykład ze zmienionego białka ras lub z fuzyjnego białka bcr/abl, które jest prezentowane w kontekście HLA–A3 na komórkach białaczkowych chorych z CML [22].

Nawet w przypadku, gdy pomiędzy biorcą i dawcą istnieje pełna zgodność antygenów głównego układu zgodności tkankowej, to antygeny mniejszego układu zgodności tkankowej cechuje polimorfizm, powodujący, że zawsze są one rozpoznawane jako obce przez limfocyty

---

T dawcy. Cytotoksyczne limfocyty T (CD8+) rozpoznające peptydy w kontekście MHC klasy I powodują lizę komórek docelowych w oparciu o mechanizm wydzielania perforyn i granzymów oraz produkcję cytokin prozapalnych powodujących aktywację kolejnych komórek efektorowych. Pomocnicze limfocyty T (CD4+) rozpoznają peptydy prezentowane w kontekście antygenów MHC klasy II [19, 22].

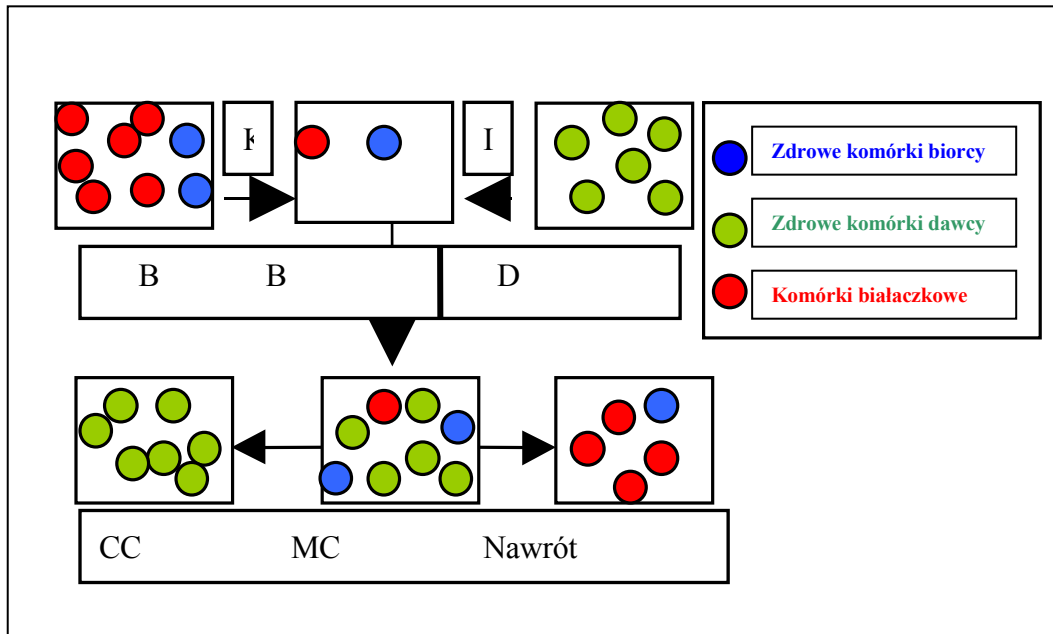
#### 1.4. Chimeryzm hematopoetyczny

W wyniku allogenicznej transplantacji u biorcy dochodzi do zniszczenia patologicznego klonu komórek nowotworowych, zagnieżdżenia się macierzystych komórek hematopoetycznych dawcy i odtworzenia prawidłowego układu krwiotwórczego i immunologicznego charakteryzujących się genotypem dawcy. Dochodzi do tego stopniowo poprzez fazę równowagi ilościowej populacji komórek biorcy i dawcy aż do całkowitego przejścia funkcji krwiotwórczej przez komórki hematopoetyczne pochodzące od dawcy. Całość tego zjawiska nosi miano **chimeryzmu hematopoetycznego**. Zgodnie z terminologią stosowaną w literaturze wyróżnia się:

- **mieszany chimeryzm hematopoetyczny (MC, z ang. *mixed haematopoietic chimerism*)**, polegający na równoczesnej obecności w układzie immunologicznym i krwiotwórczym biorcy komórek pochodzących od dawcy i od biorcy
- **całkowity chimeryzm hematopoetyczny (CC, z ang. *complete haematopoietic chimerism*)**, polegający na obecności w układzie immunologicznym i krwiotwórczym biorcy komórek pochodzących wyłącznie od dawcy
- **chimeryzm rozszczepiony (SC, z ang. *split haematopoietic chimerism*)** we wszystkich, za wyjątkiem jednej, liniach komórkowych układu krwiotwórczego i immunologicznego występują komórki pochodzące od dawcy

Na Rycinie 2 przedstawiono schematyczny mechanizm przebiegu powstawania mieszanego i całkowitego chimeryzmu u pacjenta poddanego allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych.

**Rycina 2. Schemat powstawania chimeryzmu**



Proces powstawania chimeryzmu hematopoetycznego. Biorca (B) zakwalifikowany do transplantacji, w którego organizmie znajdują się jego zdrowe (Z) i białaczkowe (N) komórki jest poddawany kondycjonowaniu (K). Tak przygotowany biorca poddawany jest zabiegowi infuzji (I) komórek dawcy (D). Po transplatacji (na dole schematu) organizm biorcy staje się mieszaną chimerą (MC), czyli wykazuje równoczesną obecność powstałych *de novo* komórek dawcy (D) i własnych resztkowych komórek (Z i N). Ten stan równowagi może przechylić się w stronę przyjęcia się przeszczepu (GvHD i GvL) i wówczas organizm biorcy staje się całkowitą chimerą (CC) lub dochodzi do odrzucenia przeszczepu i do nawrotu choroby podstawowej wówczas w organizmie biorcy występują wyłącznie jego zdrowe (Z) i białaczkowe (N) komórki.

Mieszany chimeryzm dłużej utrzymuje się po alloNMSCT, co tłumaczy się mniejszą toksycznością chemioterapii kondycjonującej podanej przed wykonaniem transplantacji. Na wytworzenie tolerancji i na dynamikę wszczepienia mają wpływ nie tylko zastosowane warunki kondycjonowania ale również intensywność leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu [26]. W wytworzeniu stanu mieszanego chimeryzmu obrazującego tolerancję między komórkami dawcy i biorcy ważna jest delecja limfocytów T potencjalnie reaktywnych w stosunku do komórek dawcy i komórek biorcy zachodząca w grasicy [27, 28].

Wykrycie sekwencji DNA (namnożonych w reakcji PCR) pochodzących w głównej części od dawcy zazwyczaj poprzedza kliniczne oznaki przemawiające za przyjęciem się przeszczepu. Prawidłowość ta została zdefiniowana i określona mianem wszczepienia molekularnego [29]. Zaobserwowano, że po przeszczepieniu allogenicznym istnieją duże różnice w czasie, który upływa od momentu stwierdzenia wszczepienia molekularnego do chwili wszczepienia hematologicznego definiowanego jako liczba neutrofilii przekraczająca 500/ $\mu$ l i płytek powyżej 20.000/ $\mu$ l we krwi obwodowej.

---

## 1.5. Metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego

Na przestrzeni minionych lat do oceny chimeryzmu hematopoetycznego stosowano różne techniki. Niektóre z nich są używane do dzisiaj, inne natomiast ze względu na swoją niską informatywność i czułość straciły już na znaczeniu. Poniżej dokonano charakterystyki historycznych i najpopularniejszych obecnie metod służących ocenie chimeryzmu hematopoetycznego.

**Antygeny erythrocytarne.** Jedną z najstarszych metod służących ocenie chimeryzmu hematopoetycznego jest metoda wykorzystująca badanie antygenów powierzchniowych na erytrocytach. Technika ta opierała się na ocenie antygenów z grup: AB0, MN, Rh, Kell, Kid, Duffy, Latheran, Ss i P erytrocytów dawcy i biorcy. Obecnie nie stosuje się tej metody ze względu na trudności w interpretacji wyników. Erytrocyty charakteryzują się stosunkowo długim czasem przeżycia w krwi obwodowej, w związku z tym może dochodzić do zafałszowania uzyskiwanych wyników.

**Markery enzymatyczne.** Metoda ta opiera się na zjawisku polimorfizmu enzymatycznego występującego w erytrocytach i leukocytach. Enzymy występujące w różnych izoformach, identyfikowanych ze względu na różną ruchliwość elektroforetyczną białek, to: kwaśna fosfataza, dehydrogenaza glikozo-6-fosforanu, fosfoglukomutaza, deaminaza adenozykowa i esteraza D. Metoda ta nie jest obecnie stosowana. W przypadku erytrocytów zdecydowały względy omówione powyżej. Ocena polimorfizmu enzymatycznego w subpopulacji leukocytów była dobrym markerem chimeryzmu hematopoetycznego, została jednak zastąpiona przez metody oparte na DNA charakteryzujące się mniejszą czaso- i pracochłonnością, a tym samym większą przydatnością dla celów diagnostycznych.

**Antygeny układu HLA.** Antygeny HLA są użytecznymi markerami tylko w przypadku braku zgodności w układzie HLA między biorcą a dawcą przeszczepu. Początkowo zgodność HLA była oceniana metodą serologiczną, którą zastąpiono bardziej czułą metodą opartą na analizie DNA. Ze względu na to, iż rozwinęły się inne metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego bazujące na ocenie DNA oparte o markery niezależne od zgodności lub jej braku w układzie HLA, metoda ta nie jest obecnie stosowana.

**Allotypy immunoglobulin.** Technika ta była informatywna zaledwie u 50% spokrewnionych par dawców i biorców, a stosowana metoda miała charakter póliłościowy. Dodatkowe trudności, takie jak długie przeżycie immunoglobulin w osoczu, które sugerowało utrzymujący się, mimo wszczepienia, uporczywy chimeryzm biorcy, jak i wpływ na wynik

---

transfuzji i immunoglobulinowej terapii zastępczej spowodowały, że obecnie technika ta nie jest stosowana.

**Konwencjonalna cytogenetyka.** Metoda ta polega na analizie chromosomów metafazowych. Ma ona jednak kilka ograniczeń. Podstawą oceny chimeryzmu hematopoetycznego jest chromosom Y. Nie można tej metody zastosować do par biorca – dawca zgodnych pod względem płci, ponadto ocena chimeryzmu jest ograniczona do komórek, które w momencie pobrania szpiku znajdowały się w metafazie. Ilość metafaz analizowanych w czasie jednego testu jest ograniczona do 20 – 30 komórek, co nie zawsze odzwierciedla stan całej populacji komórek hematopoetycznych. Sama technika jest bardzo czaso- i pracochłonna, a ocena prowadzona tą metodą wymaga dużego doświadczenia. To wszystko sprawia, że konwencjonalna cytogenetyka jest obecnie rzadko stosowana.

**Cytogenetyka molekularna.** Przy użyciu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) analizie poddawane są zarówno komórki metafazowe jak i interfazowe. W czasie pojedynczego testu analizuje się dużą ilość komórek, co zapewnia wysoką czułość reakcji. Metoda ta jest oparta na hybrydyzacji specyficznej sondy fluorescencyjnej do ludzkiego chromosomu Y. Potencjalnymi trudnościami związanymi z omawianą metodą są: utrata chromosomu Y w komórkach o kariotypie nowotworowym lub zmiany genetyczne w chromosomie Y uniemożliwiające hybrydyzację sondy molekularnej. Z tego powodu metodę tę udoskonalono poprzez dodanie drugiej sondy, wybarwionej innym chromoforem, specyficznej dla chromosomu X. Przy zastosowaniu tej techniki górny limit komórek fałszywie XX pozytywnych u mężczyzn to 0,63% a fałszywie pozytywnych XY u kobiet to 0,30%. Jednak metodę FISH można zastosować jedynie w układach różnopłciowych [30–32].

**Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych.** Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu DNA do oceny chimeryzmu hematopoetycznego pojawiły się już w 1985 roku. Później Blazar *et al.* zaadaptowali ocenę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) [33], stosowane dotychczas w analizach ludzkich chorób genetycznych, do szacowania chimeryzmu po alloSCT. W metodzie tej wykorzystano specyfikę aktywności endonukleaz restrykcyjnych polegającą na przecinaniu nici DNA tylko w obrębie ściśle określonych sekwencji nukleotydowych lub w zdefiniowanej odległości od nich. Powoduje to, że identyczne fragmenty DNA są rozcinane na fragmenty równej długości. Wystąpienie jakichkolwiek aberracji w miejscu restrykcyjnym (mutacji, delecji, insercji) powoduje zmianę długości produktu powstałego po trawieniu enzymem na skutek utraty miejsca restrykcyjnego, bądź powstania nowego. Populacja ludzka wykazuje ogromny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, co umożliwia identyfikację osobniczą

---

i z powodzeniem było i jest wykorzystywane do odróżnienia DNA dawcy i biorcy poddanego alloSCT. Metodę tę można stosować do oznaczania DNA wyizolowanego ze wszystkich komórek jednojądrzastych szpiku kostnego lub krwi obwodowej jak i subpopulacji komórkowych. Potencjalnym ograniczeniem tej metody mogą być problemy z trawieniem DNA enzymami restrykcyjnymi.

**PCR fragmentów chromosomu Y, STR i VNTR.** Analiza molekularna genomów eukariotycznych wykazała, że w przeważającej części są one złożone z sekwencji niekodujących: głównie obszarów zawartych wewnątrz intronów oraz z międzygenowych powtarzających się tzw. **sekwencji repetytywnych**. Frakcja DNA repetytywnego składająca się z powtarzających się wielokrotnie, jednakowych, krótkich sekwencji nukleotydowych nosi nazwę **satelitarnego DNA**. W zależności od ilości nukleotydów tworzących pojedyncze powtórzenie wyróżnia się:

- Satelitarny DNA (powtórzenia więcej niż 100 nukleotydowe)
- Minisatelitarny DNA (VNTR z ang. *Variable Number Tandem Repeats* powtórzenia 7-100 nukleotydowe)
- Mikrosatelitarny DNA (powtórzenia 2-6 nukleotydowe)

Grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmująca powtórzenia dwóch, trzech lub czterech nukleotydów określana jest mianem **krótkich powtórzeń tandemowych** (STR z ang. *Short Tandem Repeats*). Stwierdzono, że w organizmie człowieka znajduje się ponad 10 000 sekwencji STR i potencjalnie każda z nich może być wykorzystana do oceny chimeryzmu hematopoezy [34]. Powyższe sekwencje dziedziczą się zgodnie z regułą Mendla [35, 36]. Powtórzenia należące do tej grupy charakteryzuje duży polimorfizm, co stanowi bardzo charakterystyczną, praktycznie niepowtarzalną cechę danego organizmu, a ich wykrywanie wykorzystywane jest na potrzeby identyfikacji indywidualnej: w kryminalistyce do identyfikacji osobników, w sprawach sądowych o ustalenie ojcostwa oraz przy sporządzaniu map genetycznych o dużej rozdzielczości. Odkrycie w obrębie DNA polimorficznych alleli o wysokim stopniu heterozygotyczności w ogromnym stopniu ułatwiło i poprawiło ocenę efektów przeszczepiania komórek hematopoetycznych.

Początkowe badania wykorzystywały startery rozpoznające sekwencje DNA znajdujące się na chromosomie Y (PCR–Y). Ocena chimeryzmu była możliwa w obrębie par gdzie biorca i dawca allogenicznego przeszczepu różnili się pod względem płci. Metoda ta do dnia dzisiejszego zaliczana jest do najczulszych sposobów oceny chimeryzmu [13].

---

PCR fragmentów STR lub VNTR jest metodą bardziej niezawodną i szerzej stosowaną do detekcji mniejszościowych populacji komórkowych. Po raz pierwszy metodę tę zastosował Lawrer et al. w roku 1991 [37]. Zastosowanie do analizy techniki PCR umożliwia ocenę materiału badawczego nawet w przypadku dysponowania niewielką ilością komórek, gdyż omawiane oznaczenia można wykonywać u pacjentów tuż po allogenicznym przeszczepieniu, kiedy to średnia całkowita liczba białych krwinek wynosi około 100/ $\mu$ l (bardzo rzadko więcej niż 200/ $\mu$ l). Dodatkową zaletą tej techniki jest możliwość zniesienia ograniczeń związanych z oczyszczaniem DNA, jego hybrydyzacją i autoradiografią oraz zwiększenie czułości oznaczeń jak i możliwość retrospektywnej analizy materiału. W badaniach porównujących czułość i przydatność metod z wykorzystaniem sekwencji STR i VNTR stwierdzono, że bardziej wiarygodne rezultaty osiągnęto przy wykorzystaniu sekwencji STR [38, 39]. Pomimo stwierdzenia mniejszej czułości metody STR-PCR niż PCR-Y lub FISH, jest ona obecnie powszechnie stosowana, gdyż daje możliwość oceny chimeryzmu niezależnie od układu płci dawca – biorca w przeciwieństwie do metod FISH lub PCR-Y. Możliwość śledzenia zjawiska chimeryzmu hematopoetycznego na poziomie genomu ma ogromne znaczenie i stanowi cenne źródło informacji oraz stwarza szansę wczesnego określania skuteczności prowadzonego leczenia.

**Real Time-PCR.** Metodyka Real-Time PCR została opracowana w 1996 roku i od tego czasu ilość publikacji dotyczących wykorzystania tej metody systematycznie rośnie [40, 41]. Technologia RQ-PCR jest wykorzystywana do określania całkowitej i względnej ilości matrycy genetycznej DNA i RNA oraz do genotypowania. Znalazła ona zastosowanie w praktyce klinicznej przede wszystkim do oceny choroby resztkowej ale również do oceny chimeryzmu u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji. Analiza chimeryzmu hematopoetycznego jest możliwa po odnalezieniu alleli specyficznych dla dawcy i biorcy oraz po zaprojektowaniu sond komplementarnych do tych sekwencji tzw. allelo-specyficzny RQ-PCR. W przypadku par biorca / dawca różniących się pod względem płci chimeryzm hemopoetyczny można monitorować przy pomocy sondy specyficznej dla chromosomu Y. W przypadku zgodności pod względem płci monitorowania chimeryzmu przy pomocy RQ-PCR możliwe jest gdy:

- występują między dawcą a biorcą różnice, których przyczyną jest zjawisko polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP z and. *single nucleotide polymorphism*) [42]
- występują między dawcą a biorcą różnice, których przyczyną jest polimorfizm polegający na wystąpieniu krótkich insercji / delecji [43]



---

W niniejszej pracy do oceny chimeryzmu wykorzystano drugi z wymienionych polimorfizmów.

**Tabela 2. Czulość metod stosowanych do oceny chimeryzmu**

| <b>Metoda oznaczania chimeryzmu</b> | <b>Czulość*</b> |
|-------------------------------------|-----------------|
| Antygeny erythrocytarne             | 0,1 – 0,5%      |
| Izoenzymy                           | 10 – 30%        |
| Allotypy immunoglobulin             | 2 – 5%          |
| Klasyczna cytogenetyka              | 10 – 20%        |
| RFLP                                | 5 – 10%         |
| FISH                                | 5%              |
| PCR Y                               | >1%             |
| PCR STR / PCR VNTR                  | 0,1 – 1%        |
| RQ-PCR                              | < 0,1%          |

\*Czulość przedstawiono jako minimalny odsetek komórek dawcy / biorcy w całej puli komórkowej umożliwiający wykrycie tej mniejszościowej populacji

## **Rozdział 2**

### **CELE PRACY**

1. Ocena przydatności wybranego panelu sekwencji STR o wysokim stopniu polimorfizmu do badania chimeryzmu hematopoezy metodą ilościową u chorych na nowotworowe i nienowotworowe schorzenia układu krwiotwórczego poddanych allogenicznej

---

transplantacji komórek hematopoetycznych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie

2. Ocena przydatności wybranego panelu sekwencji o biallelicznym polimorfizmie do badania chimeryzmu hematopoezy metodą ilościową u chorych na nowotworowe i nienowotworowe schorzenia układu krwiotwórczego poddanych allogeniczej transplantacji komórek hematopoetycznych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie
3. Opracowanie i wdrożenie testu półilościowej oceny chimeryzmu hematopoetycznego opartej na technice polimerazowej reakcji łańcuchowej (STR-PCR), obrazowanej metodą analizy fragmentów (sekwenator).
4. Opracowanie i wdrożenie metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego opartej na technice ilościowej polimerazowej reakcji łańcuchowej (RQ-PCR) w czasie rzeczywistym.
5. Porównanie powyższych metod pod względem czułości, specyficzności i możliwości ich rutynowego zastosowania w laboratorium diagnostycznym.
6. Ocena zgodności wyników monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego metodami molekularnymi z wybranymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi stosowanymi do śledzenia procesu wszczepienia materiału przeszczepowego po alloSCT.
7. Określenie znaczenia wczesnego badania chimeryzmu hematopoetycznego dla przewidywania czasu i możliwości wszczepienia się materiału przeszczepowego.
8. Ustalenie optymalnego czasu rozpoczęcia, i adekwatnej częstotliwości monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentów poddanych allogeniczej transplantacji komórek macierzystych oraz określenie czasu wszczepienia molekularnego.

## **Rozdział 3**

### **MATERIAŁ I METODY**

#### **3.4 Grupa badana**

Badaniem objęto 38 osób z nowotworowymi i nienowotworowymi schorzeniami układu krwiotwórczego poddanych allogeniczej transplantacji macierzystych komórek

---

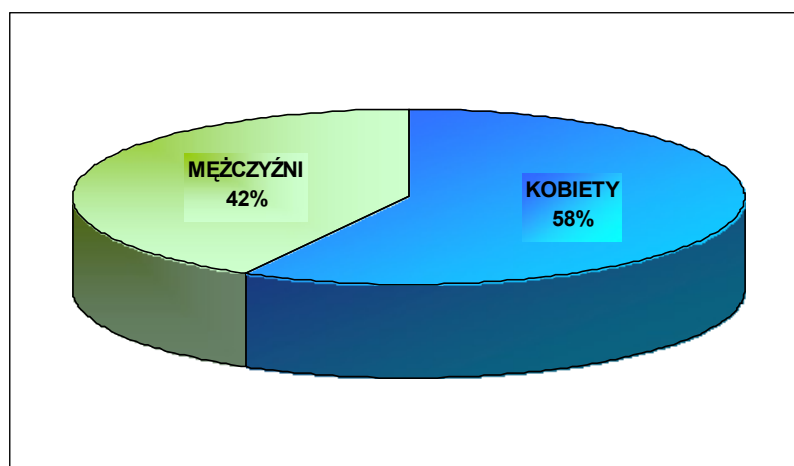
hematopoetycznych wykonanej w Katedrze i Klinice Hematologii *Collegium Medicum* UJ w latach 2002-2004. Biorcy allogenicznej transplantacji, w zależności od rodzaju chemioterapii warunkującej przyjęcie się przeszczepu (kondycjonowania), zostali podzieleni na dwie grupy. Pierwsza z nich objęła pacjentów poddanych kondycjonowaniu standardowemu (alloSCT), a w drugiej znaleźli się pacjenci, u których zastosowano kondycjonowanie o zmniejszonej toksyczności (alloNMSCT).

### 3.4.1 Liczebność i charakterystyka badanej grupy

Monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego prowadzono u 38 pacjentów, u których wykonano łącznie 43 allogeniczne transplantacje. Wszystkie przeszczepienia przeprowadzono od dawców spokrewnionych (rodzeństwo).

Na Rycinie 3 zilustrowano procentowy rozkład płci oszacowany dla 38 biorców przeszczepienia allogenicznego, który kształtuje się jak 2 : 3, odpowiednio mężczyźni : kobiety.

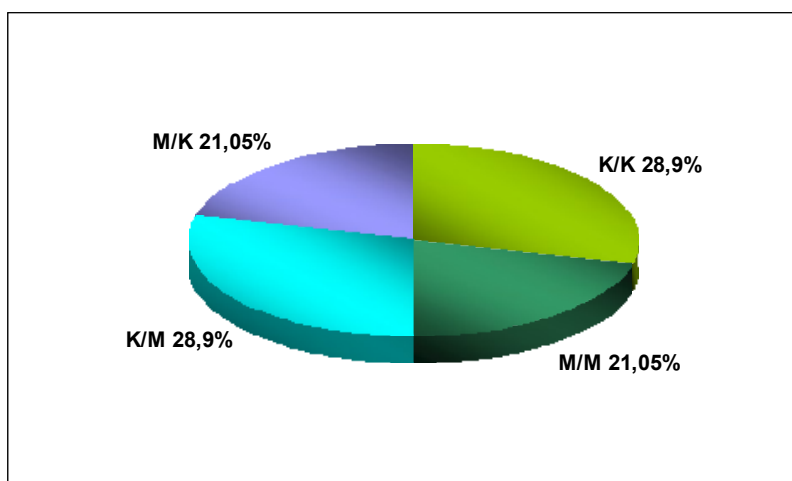
**Rycina 3. Rozkład płci biorców**



---

Rycina 4 przedstawia procentowy rozkład układu płci w 38 badanych parach biorca / dawca. Ilość par zgodnych pod względem płci stanowi połowę wszystkich par włączonych do badania.

**Rycina 4. Układ płci w parach biorca / dawca**



K/K – kobieta/kobieta, M/M – mężczyzna/mężczyzna, K/M – kobieta/mężczyzna, M/K – mężczyzna/kobieta

W Tabeli 3a i 3b (Aneks Tabele) przedstawiono dokładną charakterystykę badanej grupy pacjentów obejmującą rodzaj schorzenia stanowiącego wskazanie do transplantacji, pochodzenie i ilość hematopoetycznych komórek macierzystych CD34+ i komórek mononuklearnych, rodzaj chemioterapii warunkującej przyjęcie się przeszczepu, wiek biorcy w momencie przeszczepienia oraz płeć biorcy i dawcy. Połowę z 43 przeprowadzonych transplantacji stanowiły przeszczepienia poprzedzone kondycjonowaniem o zmniejszonej toksyczności. Każdą allogeniczną transplantację wykonaną u danego pacjenta traktowano indywidualnie, co wyrażało się nadaniem kolejnego numeru przy inicjałach i symbolu I° - dla pierwszego lub II° - dla następnego przeszczepienia.

## 3.2 Narzędzia badawcze

### 3.2.1 Odczynniki

Poniżej przedstawiono odczynniki i materiały zużywalne wykorzystane w niniejszej pracy badawczej.

- HISTOPAQUE -1077 – SIGMA Aldrich (St. Louis, USA)

- 
- PBS - BIOMED Wytwórnia Surowic i Szczepionek (Lublin, Polska)
  - Chlorek Amonu - StemCell Technologies (Vancouver, Canada)
  - Kolumny magnetyczne do separacji MiniMacs – Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Niemcy)
  - Przeciwciała monoklonalne CD 3 opłaszczone ferromagnetykiem MicroBeads – Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Niemcy)
  - Zestaw QIAamp DNA Blood Mini – QIAGEN (Hilden, Niemcy)
  - Woda wolna od nukleaz – Promega (Madison, USA)
  - Startery do reakcji PCR znakowane barwnikiem fluorescencyjnym Cy 5.0 i nieznakowane – TibMolBiol (Poznań, Polska)
  - Zestaw deosynukleotydów trójfosforanowych (dNTP) – Promega (Madison, USA)
  - Zestaw do reakcji PCR zawierający polimerazę DNA AmpliTaq Gold Applied Biosystems – Roche (New Jersey, USA)
  - Zestaw do reakcji PCR zawierający polimerazę DNA Fast Start Taq – Roche (Indianapolis, USA)
  - Zestaw do reakcji PCR przeprowadzanej w czasie rzeczywistym QuantiTect SYBR Green PCR – QIAGEN (Hilden, Niemcy)
  - Agaroz – 1000 – Invitrogen Life Technologies (Paisley, Wielka Brytania)
  - Bromek etydyny- Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Niemcy)
  - Standard masowy DNA “M1” – DNA Gdańsk (Gdańsk, Polska)
  - Bufor TAE (Tris-Acetate –EDTA) – QBIogen (Heidelberg, Niemcy)
  - SureFill 6% żel akrylamidowy – Bayer HealthCare (Tarrytown, USA)
  - Microcel cassette – Visible Genetics (Toronto, Kanada)
  - Stop loading Dye Bulk - Visible Genetics (Toronto, Kanada)
  - Tris-Borate- EDTA (TBE) – Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Niemcy)
  - EDTA - Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Niemcy)
  - Albumina wołowa BSA - Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Niemcy)
  - Etanol – POCh (Gliwice, Polska)
  - Materiały zużywalne (probówki, końcówki) – Sarstedt (Nübrecht, Niemcy)
  - Materiały zużywalne do ilościowej reakcji PCR (probówki, płytki, czapeczki) – Applied Biosystems (Foster City, USA)

### **3.2.2. Aparatura**

- 
- W czasie wykonywania pracy posługiwano się następującą aparaturą badawczą:
- Aparat do amplifikacji DNA Termocykler PTC – 220 DYAD - MJ Research
  - System do amplifikacji DNA (termocykler PE 9600) i analizy produktu w czasie rzeczywistym (Sequence Detection System 7700) ABI PRISM 7700 – Applied Biosystems (Foster City, USA)
  - Sekwencjator do analizy długości produktów Long-Read Tower Open Gene System– Visible Genetics (Evry, Francja)
  - Aparat do fotopolimeryzacji żeli akrylamidowych Gel Toaster – Visible Genetics (Evry, Francja)
  - Aparaty do agarozowej elektroforezy horyzontalnej – BioRad (Hercules, USA) i SIGMA Laborzentrifugen (Wiedeń, Austria)
  - Wirówka stołowa z chłodzeniem 2K15 – SIGMA Laborzentrifugen (Wiedeń, Austria)
  - Wirówka stołowa z chłodzeniem 1K15 – SIGMA Laborzentrifugen (Wiedeń, Austria)
  - Wirówka stołowa - Sarstedt (Nübrecht, Niemcy)
  - Transluminator TFX–20.M do analizy żeli agarozowych w świetle UV – (Torcy, Francja)
  - Spektrofotometr UV/VIS Genesys 2 – ThermoSpectronic (Rochester, USA)
  - Łaźnia laboratoryjna – AJL electronic (Kraków, Polska)
  - Waga analityczna – Radwag (Radom, Polska)
  - Zamrażarka -80°C – NuAire

### **3.2.3. Programy komputerowe**

Do interpretacji i opracowania uzyskanych wyników posłużyły następujące programy komputerowe:

- Irfan View v. 4.0
- Sequence Detection System – Applied Biosystems
- Open Step Software Gene Objects Fragment v. 3.1 – Visible Genetics
- Statistica v. 5.0 - StatSoft

### **3.2.4. Bazy danych**

- 
- <http://gai.nci.nih.gov/cgi-bin> charakterystyka primerów z reakcji STR-PCR

### **3.3 Metody**

#### **3.3.1. Postępowanie z materiałem biologicznym przed allogeniczną transplantacją**

Przed allogeniczną transplantacją od biorcy i dawcy przeszczepu pobierano krew obwodową do probówki z EDTA, jako antykoagulantem, w stosunku 9:1, a następnie izolowano komórki jednojądrzaste. Z zawiesiny komórek jednojądrzastych izolowano DNA, które służyło do ustalenia profilu genetycznego dawcy i biorcy pod względem sekwencji o wysokim stopniu polimorfizmu (metoda z wykorzystaniem sekwenatora) i o dwuallelicznym polimorfizmie (metoda z wykorzystaniem techniki RealTime PCR).

#### **3.3.2 Postępowanie z materiałem biologicznym po allogenicznej transplantacji**

Od pacjentów po przeprowadzeniu allogenicznej transplantacji pobierano próbki krwi obwodowej lub szpiku kostnego do probówek z EDTA w stosunku odpowiednio 9:1 i 4,5:0,5. Kolejnym krokiem była izolacja komórek jednojądrzastych i DNA, a następnie na podstawie uzyskanego materiału genetycznego ocena procentowego udziału dawcy i biorcy w hematopoezie zachodzącej w organizmie biorcy.

#### **3.3.3 Częstotliwość monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego**

Przebieg przyjmowania się przeszczepu u biorcy po wykonaniu allogenicznej transplantacji był monitorowany w następujących odstępach czasowych: przez pierwsze dwa tygodnie co drugi dzień, doba +21, +28, następnie co miesiąc do +180 doby, co 3 miesiące w pierwszym roku, a następnie co pół roku (łącznie 18 punktów czasowych). W przypadku wykonania u pacjenta infuzji limfocytów dawcy (DLI) zwiększano częstotliwość monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego. Chimeryzm badano dodatkowo każdorazowo w przypadku pojawienia się objawów klinicznych mogących świadczyć o nawrocie choroby.

---

### **3.3.4 Izolacja komórek jednojądrzastych (MNC) ze szpiku lub krwi obwodowej**

Przed wykonaniem transplantacji oraz w czasie monitorowania procesu przyjmowania się przeszczepu allogenicznego z krwi obwodowej lub ze szpiku kostnego biorcy (a przed transplantacją również dawcy) izolowano komórki jednojądrzaste (MNC). Izolację wykonywano w gradiencie gęstości przy użyciu odczynnika Histopaque – 1077 firmy SIGMA według standardowej procedury podanej w ulotce informacyjnej.

### **3.3.5 Separacja subpopulacji limfocytów T**

Separację subpopulacji komórkowej CD3<sup>+</sup> wykonywano przy pomocy kolumn magnetycznych MiniMacs firmy Miltenyi Biotec. Zasadą rozdziału są oddziaływania magnetyczne powstające pomiędzy przeciwciałami monoklonalnymi połączonymi z ferromagnetykiem opłaszczającymi antygeny powierzchniowe CD3<sup>+</sup>, a kolumną umieszczoną w magnezie. Separację subpopulacji wykonywano według standardowej procedury zamieszczonej w ulotce informacyjnej.

### **3.3.6 Izolacja materiału genetycznego**

Matrycą służącą do badania chimeryzmu hematopoetycznego było DNA genomowe. Izolację materiału genetycznego wykonywano przy pomocy zestawu kolumnowego do izolacji DNA QIAamp Blood Mini firmy QIAGEN na zasadzie chromatografii powinowactwa. Izolację DNA przeprowadzano według standardowej procedury zgodnie z zaleceniami producenta.

### **3.3.7 Pomiar ilości materiału genetycznego**

Ilość i czystość uzyskanego DNA genomowego oceniano przy pomocy spektrofotometru. Długość fali światła pozwalająca na ocenę ilości DNA to 260 nm. Czystość



---

uzyskanego DNA genomowego oceniano poprzez współczynnik  $R = A_{260nm} / A_{280nm}$ , gdzie absorbancja mierzona przy 280nm odpowiada zanieczyszczeniu materiału genetycznego przez białko. Próbki DNA przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.8 Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR)

PCR (polimerazowa reakcja łańcuchowa) jest techniką wielokrotnego powielania odcinków DNA o długości od kilkudziesięciu do kilkuset par nukleotydów. W technice PCR wyjściową matrycą jest wyizolowany DNA. W obecności termostabilnej polimerazy DNA, jonów magnezu, mieszaniny deoksynukleotydów trójfosforanowych (dNTP) oraz nadmiaru starterów (primerów), dochodzi do wykładniczego powielania matrycy (czyli wybranego odcinka DNA). Pojedynczy cykl obejmuje następujące etapy:

- Denaturacja powielanego DNA w temperaturze około  $94 - 95^{\circ}\text{C}$ ;
- Przyłączenie starterów (primerów) stanowiących miejsce startu dla polimerazy;
- Replikacja DNA zachodząca przy udziale polimerazy DNA i dNTP

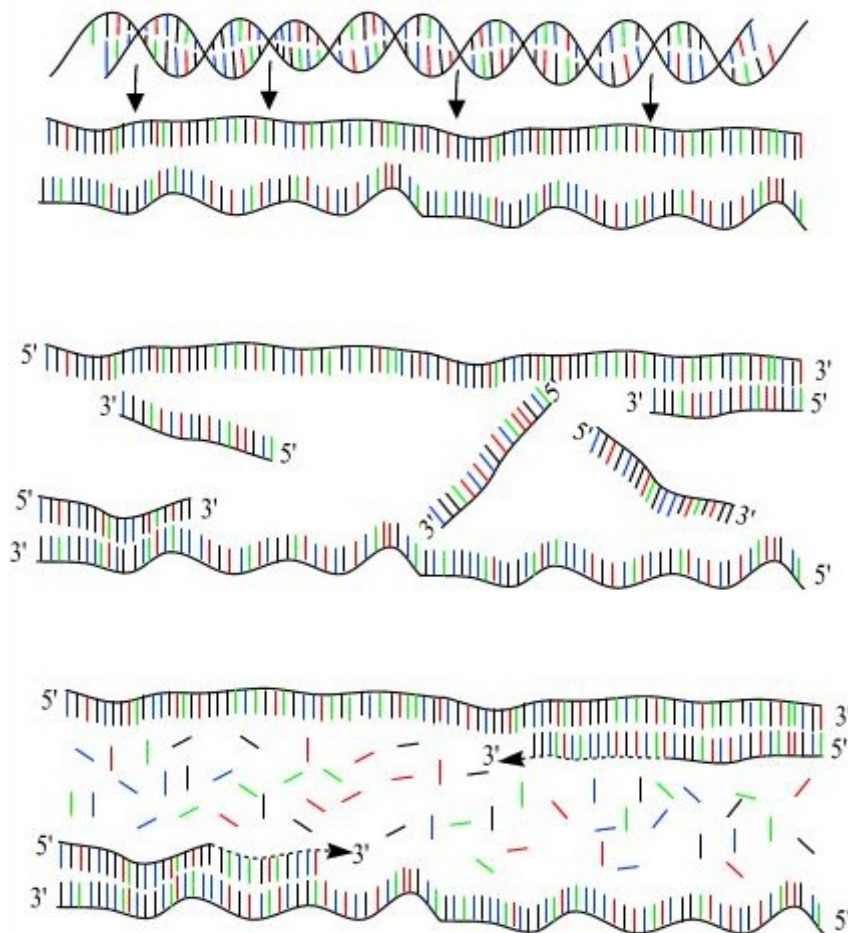
Rycina 5. Schematycznie przedstawiona zasada reakcji PCR (wg

30.40 CYKLI  
OBEJMUJĄCYCH  
KROKI  
1 – 3

**KROK 1 –**  
DENATURACJA  
 $94 - 95^{\circ}\text{C}$

**KROK 2 –**  
PRZYŁĄCZANIE  
PRIMERÓW  
 $50 - 68^{\circ}\text{C}$

**KROK 3 –**  
WYDŁUŻANIE  
PRODUKTU  
 $68 - 72^{\circ}\text{C}$



Polimerazowa reakcja łańcuchowa daje możliwość monitorowania choroby resztkowej z czułością  $10^{-6}$  (wykrywa 1 komórkę nowotworową wśród 1.000.000 komórek zdrowych). Tak ogromna czułość reakcji jest możliwa dzięki przeprowadzaniu reakcji PCR w dwóch etapach: tzw. zewnętrznej i wewnętrznej PCR. W pierwszej z tych reakcji matrycą, która ulega amplifikacji jest specyficzna sekwencja stanowiąca integralną część całkowitego cDNA powstającego w reakcji odwrotnej transkrypcji. W reakcji drugiej matrycą jest specyficzna sekwencja odpowiadająca aberracji genetycznej, która uległa amplifikacji w reakcji zewnętrznej. W przypadku materiału pobranego od pacjenta w momencie diagnozy prążek odpowiadający poszukiwanej sekwencji cDNA (tzw. pozytywny) pojawia się w reakcji zewnętrznej. W czasie monitorowania choroby resztkowej obserwuje się stopniowe obniżanie ilości transkryptu, co objawia się tym, że prążek pozytywny pojawia się dopiero w reakcji wewnętrznej lub nawet całkowicie zanika. Ta ostatnia sytuacja nosi nazwę remisji molekularnej. Jeżeli dochodzi do ponownej amplifikacji prążka pozytywnego w reakcji wewnętrznej, a potem również zewnętrznej to jest to równoznaczne z nawrotem choroby podstawowej.

---

Oznaczenia procentowego udziału dawcy i biorcy w hematopoezie zachodzącej w organizmie biorcy były wykonywane dwiema odmiennymi metodami bazującymi na polimerazowej reakcji łańcuchowej.

### 3.3.9 Ocena chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy metody STR-PCR

Metoda STR-PCR łączy w sobie etap amplifikacji DNA przeprowadzanej w czasie jakościowej reakcji PCR i analizę uzyskanego produktu podczas rozdziłu w sekwenatorze. Metodę STR-PCR zwykle się określać mianem metody ilościowej ze względu na jej ograniczenia, które w sposób szczegółowy zostaną omówione w Dyskusji.

Do badania chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy metody STR-PCR wybrano na podstawie publikacji autorstwa Dubovsky i wsp. [29] sekwencje STR (z ang. *short tandem repeats* – krótkie powtórzenia tandemowe) oraz zaczerpnięto sekwencje starterów. Tabela 4 (Aneks Tabele) przedstawia charakterystykę wybranych sekwencji STR a Tabela 5 (Aneks Tabele) - informacje dotyczące starterów do reakcji STR-PCR.

Do monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego metodą STR-PCR dla każdej pary biorca / dawca wybierano dwie sekwencje STR określane mianem informatywnych, czyli takich, w których przynajmniej 1 allel był specyficzny dla biorcy.

W stosunku do publikacji źródłowej [29] dokonano kilku modyfikacji. Pierwsza polegała na wyznakowaniu znacznikiem fluorescencyjnym jednego ze starterów w każdej parze. Wiązało się to ściśle ze sposobem detekcji uzyskiwanego produktu reakcji PCR (przy pomocy sekwenatora), który także zmieniono. Zmodyfikowano również rodzaj używanej polimerazy, stosowany profil temperaturowy i ilość DNA poddawanej amplifikacji (szczegółowy opis poniżej). Jakościową reakcję PCR przeprowadzano przy użyciu polimerazy typu „hot start”, o nazwie firmowej AmpliTaq GOLD zgodnie z następującym profilem temperaturowym:

- 95°C – 10 minut
  - 94°C – 30 sekund
  - 60°C – 30 sekund
  - 72°C – 45 sekund
  - 72°C – 10 minut
- } 30cykli

---

Łączna objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25  $\mu$ l a jej skład przedstawiono w Tabeli 6 (Aneks Tabele). Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 5  $\mu$ l DNA genomowego o stężeniu 10ng/ $\mu$ l (łącznie 50ng), a następnie całość amplifikowano w termocyklerze.

### **3.3.10 Analiza długości fragmentów**

Po przeprowadzeniu jakościowej reakcji PCR produkt amplifikacji poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w sekwenatorze płytowym Open Gen w 6% żelu poliakrylamidowym (fotopolimeryzacja akrylamidu w świetle UV) w buforze TBE. Pozostałe warunki rozdzielania takie jak wymagane napięcie (1300V), moc lasera (50%), czas rozdzielania (30minut) oraz temperatura żelu w czasie rozdzielania (53°C) ustalono na podstawie pracy autorstwa Luhm i wsp. [44].

Przed nałożeniem na żel poliakrylamidowy produkt reakcji PCR przygotowywano w następujący sposób:

- 1  $\mu$ l produktu dodawano do 10  $\mu$ l Stop Loading Dye Bulk 3x rozcieńczonego
- Przygotowaną mieszaninę denaturowano w 95°C przez 5 minut
- Produkt po denaturacji umieszczano w lodzie

Po schłodzeniu nakładano 2  $\mu$ l produktu na żel poliakrylamidowy. Przy każdorazowym rozdzielaniu na żel oprócz próbki badanej nakładano materiał genetyczny dawcy i biorcy uzyskany przed allogeniczną transplantacją, jako wzorcowe próbki układu alleli dla badanej sekwencji STR u danego pacjenta.

### **3.3.11 Kontrola poprawności izolacji DNA**

Jako kontrolę poprawności izolacji DNA wykonywano jakościową reakcję PCR na obecność DNA dla genu GAPDH przy użyciu polimerazy typu „hot start” o nazwie firmowej Fast Start Taq DNA. Zastosowany profil temperaturowy oraz stężenie poszczególnych odczynników i materiału genetycznego były identyczne jak w przypadku metody służącej ustaleniu profilu genetycznego wykorzystywanego w metodzie ilościowej reakcji PCR.

---

### 3.3.12 Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym

W celu oceny profilu genetycznego wykorzystywanego w metodzie ilościowej reakcji PCR oraz uwidocznienia genu GAPDH przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym przygotowanym w buforze TAE wybarwionym bromkiem etydyny względem wzorca masowego uzyskanych produktów DNA (rozmiar prążków we wzorcu masowym DNA: 501,489bp, 404bp, 331bp, 242bp, 190bp, 147bp, 110bp).

Rezultaty rozdziału elektroforetycznego wizualizowano w świetle UV i dokumentowano przy użyciu aparatu cyfrowego. Uzyskane informacje zachowano na twardym dysku komputera, a do detekcji i obróbki uzyskanych danych wykorzystywano program Irfan View®.

### 3.3.13 Reguły matematyczne stosowane do oceny chimeryzmu metodą STR-PCR

Podstawą oceny chimeryzmu hematopoetycznego półilościową metodą STR-PCR było określenie pola powierzchni pod pikami uzyskanymi w wyniku rozdziału fragmentów w sekwenatorze, które reprezentowały poszczególne allele. Wartości te posłużyły do wyliczenia procentowego udziału dawcy i biorcy w hematopoezie zachodzącej w organizmie biorcy w oparciu o wzory matematyczne przedstawione w literaturze [44-47]. W zależności od ilości alleli informatywnych (cztery, dwa lub jeden) stosowano 3 różne reguły matematyczne. W przedstawionych poniżej wzorach przyjęto następujące oznaczenia:

- **B** (z cyfrą lub bez) odpowiada polu powierzchni pod pikiem odpowiadającym allelowi reprezentującemu biorcę alloSCT
- **D** (z cyfrą lub bez) odpowiada polu powierzchni pod pikiem odpowiadającym allelowi należącemu do dawcy alloSCT
- **W** oznacza pole powierzchni pod pikiem odpowiadającym allelowi wspólnemu dla biorcy i dawcy alloSCT

Pierwsza z przedstawionych formuł dotyczy sytuacji gdy biorca i dawca alloSCT są heterozygotami i żaden z alleli nie jest wspólny, czyli ocena chimeryzmu jest przeprowadzana w oparciu o cztery allele informatywne:

$$\% \text{ hematopoezy dawcy} = \frac{D1 + D2}{D1 + D2 + B1 + B2} \times 100\%$$

---

W sytuacji, gdy biorca i dawca są heterozygotami lecz mają jeden wspólny allel równanie służące wyrażeniu procentowego udziału hematopoezy dawcy przedstawia się następująco:

$$\% \text{ hematopoezy dawcy} = \frac{D}{D + B} \times 100\%$$

Jeżeli tylko jedna z osób w parze biorca / dawca jest heterozygotą a druga homozygotą, czyli wówczas gdy występuje tylko jeden allel informatywny, obliczenia przedstawiają się następująco:

**Założenie:** biorca jest heterozygotą a dawca jest homozygotą

a) Ustalenie współczynnika **CF** z danych dotyczących DNA biorecy przed alloSCT:

$$CF = \frac{W}{B} \quad (1)$$

b) Ustalenie udziału allelu biorecy (wskaźnik **HC**) w piku odpowiadającemu allelowi wspólnemu w badanym materiale DNA po alloSCT :

$$HC = B \times CF \quad (2)$$

c) Ustalenie udziału allelu dawcy (wskaźnik **DAA**) w piku odpowiadającemu allelowi wspólnemu w badanym materiale DNA po alloSCT :

$$DAA = W - HC \quad (3)$$

d) Ustalenie udziału allelu dawcy (wskaźnik **SDAA**) w piku odpowiadającemu allelowi wspólnemu w badanym materiale DNA po alloSCT :

$$SDAA = \frac{DAA}{2} \quad (4)$$

e) Ustalenie udziału hematopoezy biorecy w badanym materiale po alloSCT:

$$\% \text{ hematopoezy biorecy} = \frac{B}{B + SDAA} \times 100\% \quad (5)$$

f) Ustalenie udziału hematopoezy dawcy w badanym materiale po alloSCT

$$\% \text{ hematopoezy dawcy} = 100\% - \% \text{ hematopoezy biorecy} \quad (6)$$

### 3.3.14 Ustalenie profilu genetycznego dla metody RQ-PCR

Metoda RQ-PCR (ilościowa metoda oceny chimeryzmu hematopoetycznego) opiera się na występowaniu sekwencji charakteryzujących się dwuallelicznym polimorfizmem, co w

---

praktyce przekłada się na dwie sytuacje: obecność lub brak pewnej niekodującej sekwencji DNA u danego człowieka.

Wybór sekwencji informatywnej dla każdej pary biorca / dawca przeprowadzano wykonując jakościową reakcję PCR. Jako sekwencję informatywną traktowano allel występujący jedynie u biorcy lub jedynie u dawcy. W stosunku do publikacji źródłowej [43] dokonano zmiany zastosowanej polimerazy oraz ilości DNA poddanego amplifikacji (50ng DNA / 25 $\mu$ l). Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę Fast Start Taq DNA przedstawiono w Tabeli 7 (Aneks Tabele).

### **3.3.15 Ocena chimeryzmu metodą ilościowej reakcji PCR (RQ-PCR)**

Ilościowa reakcja PCR wykonywana w czasie rzeczywistym (nazwy równorzędne: RQ-PCR, Real Time PCR, TaqMan) jest nowoczesną metodą umożliwiającą równoczesną amplifikację i detekcję produktu, służącą ocenie, np. ekspresji genów lub choroby resztkowej. Jest także stosowana do oceny i monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji macierzystych komórek hematopoetycznych.

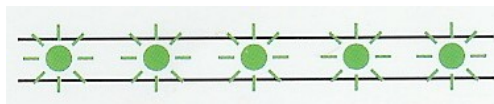
Monitorowanie kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego w każdej parze biorca / dawca przeszczepienia allogenicznego prowadzono na podstawie jednej dwuallelicznej insercji / delecji wybranej w sposób opisany powyżej w podrozdziale 3.3.12. Jako gen referencyjny posłużył gen GAPDH. Reakcję RQ-PCR wykonywano w dubletach. Wyboru sekwencji o dwuallelicznym polimorfizmie, starterów i profilu temperaturowego dokonano na podstawie publikacji autorstwa Alizadeh i wsp. [43]. W stosunku do publikacji źródłowej zastosowano modyfikację polegającą na zmniejszeniu ilości amplifikowanego DNA 150ng/25 $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej). Zmieniono także sposób detekcji produktu wprowadzając barwnik fluorescencyjny SYBR green (chemia SYBR green) zamiast pierwotnie zastosowanych sond molekularnych (chemia TaqMan). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 8 (Aneks Tabele).

SYBR green interkaluje do dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych, po czym następuje emisja sygnału fluorescencyjnego wprost proporcjonalna do ilości kopii amplifikowanego produktu. Wyjściowa ilość DNA jest odczytywana na podstawie wartości Ct, czyli numeru cyklu reakcji, w którym po raz pierwszy obserwuje się logarytmiczny przyrost ilości produktu. W celu określenia ilości badanego allelu dla każdej pary biorca / dawca, na podstawie amplifikacji próbek o znanym stężeniu DNA, wykreślano krzywą standardową. Dla

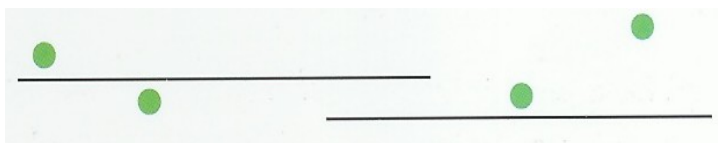
każdej z próbek DNA zebranych w czasie monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego określano wartości Ct genu badanego i genu referencyjnego, a ilość allelu oceniano względem krzywej standardowej.

### Rycina 6. Schemat technologii opartej na zastosowaniu barwnika SYBR green

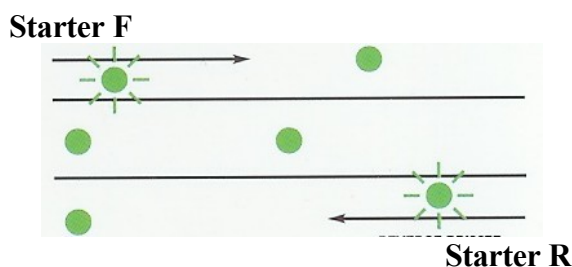
1. **Początek reakcji.** Barwnik SYBR green emituje światło fluorescencyjne, gdy ulegnie wbudowaniu do dwuniciowej struktury DNA



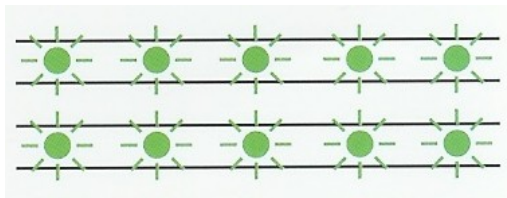
2. **Denaturacja.** Kiedy DNA ulega denaturacji barwnik SYBR green jest uwalniany a towarzyszy temu gwałtowna redukcja poziomu fluorescencji.



3. **Polimeryzacja.** W czasie wydłużania przyłączają się startery i powstaje produkt reakcji PCR.



4. **Zakończenie cyklu reakcji PCR.** W momencie zakończenia reakcji barwnik SYBR green jest związany z dwuniciową strukturą DNA i fluorescencja jest największa



Sekwencje starterów zastosowanych w reakcji RQ-PCR przedstawiono w Tabeli 9 (Aneks Tabele).

#### 3.3.16 Reguły matematyczne stosowane do oceny chimeryzmu metodą RQ-PCR



---

Wzory matematyczne służące ilościowemu wyrażeniu procentowego udziału hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu zaczerpnięto z literatury [43]. Podstawą wyliczeń jest numer cyklu reakcji (Ct), w którym następuje logarytmiczny przyrost ilości produktu reakcji RQ-PCR. Ocenę chimeryzmu hematopoetycznego przeprowadzano w następujących etapach:

- a) dla każdej reakcji RQ-PCR, czyli dla sekwencji specyficznej dla dawcy (Ct badane), sekwencji specyficznej dla biorcy (Ct badane) oraz genu referencyjnego GAPDH (Ct referencyjne) amplifikowanych w dubletach odczytywano wartość Ct
- b) dla każdego genu badanego wykonywano krzywą standardową i odczytywano współczynnik nachylenia krzywej (**s**), na podstawie którego wyliczano wydajność reakcji RQ-PCR (**E**) :

$$E = 10^{-\frac{1}{s}} - 1 \quad (1)$$

- c) dla każdej reakcji RQ-PCR genu badanego wyliczano Ct znormalizowane względem genu referencyjnego, czyli  $\Delta Ct$ :

$$\Delta Ct = Ct_{\text{badanej\_sekwencji}} - Ct_{GAPDH} \quad (2)$$

- d) wyznaczano Ct próbki kalibracyjnej, była to wartość Ct odpowiadająca amplifikacji próbki zawierające wyłącznie materiał genetyczny dawcy (w przypadku sekwencji charakterystycznej dla dawcy) lub zawierająca wyłącznie materiał genetyczny biorcy (w przypadku sekwencji charakterystycznej dla biorcy)
- e) wyliczano udział hematopoezy dawcy lub biorcy (w zależności od wybranej sekwencji):

$$\% \text{ hematopoezy dawcy} = \left( \frac{QU}{QC} = (1 + E)^{-(\Delta Ct_U - \Delta Ct_C)} \right) \times 100\% \quad (3)$$

gdzie: QU – ilość DNA w próbce badanej

QC – ilość DNA w próbce kalibracyjnej

$\Delta Ct_U$  –  $\Delta Ct$  próbki badanej

$\Delta Ct_C$  –  $\Delta Ct$  próbki kalibracyjnej

E – wydajność reakcji

## Rozdział 4

---

## WYNIKI

### 4.1 Informatywność sekwencji STR o wysokim stopniu polimorfizmu

Pierwszym etapem pracy doświadczalnej było wybranie na drodze empirycznej dla każdej pary biorca / dawca dwóch sekwencji STR o wysokim stopniu polimorfizmu pozwalających przy pomocy sekwenatora na rozróżnienie materiału genetycznego pochodzącego od każdego z nich. W Tabeli 10 (Aneks Tabele) przedstawiono zestawienie uzyskanych wyników.

Do monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego ocenianego metodą ilościową dla każdej pary biorca / dawca wybierano dwie informatywne sekwencje STR. Uzyskany wynik uśredniano, co pozwalało na zminimalizowanie błędów związanych z odczytem powierzchni pod pikami odpowiadającymi amplifikowanym allelom. Tylko w jednej parze (pacjent GM nr 30) na 38 badanych (2,6%) nie udało się znaleźć dwóch sekwencji informatywnych i chimeryzm hematopoetyczny oceniano wyłącznie w oparciu o jeden *locus* D12S1064. Z powyższych danych wynika, że wybrany panel sekwencji STR jest przydatny do oceny chimeryzmu hematopoetycznego.

### 4.2 Częstotliwość informatywnych sekwencji STR o wysokim stopniu polimorfizmu

W badanej grupie par biorca / dawca przeprowadzono ocenę częstotliwości występowania informatywnych sekwencji STR stosowanych do monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego metodą STR-PCR. Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 11 (Aneks Tabele). Wynika z nich, że największą częstotliwość różnic, niezależnie od tego czy zostały one wykorzystane do oceny chimeryzmu hemopoezy, zaobserwowano w *locus* D20S481, natomiast najmniejszą w *locus* D17S1290. Stwierdzono również, iż w żadnym *loci* genowym, z wybranych jako informatywne sekwencji STR, różnice między dawcą a biorcą nie występują w populacji z częstotliwością w sposób znacznie odbiegający od pozostałych (różnice w zakresie 12% - 17,4 %). Nie stwierdzono również zależności pomiędzy informatywnością danego *locus* genowego, a ilością alleli mogących występować w tym *locus*. Na podstawie powyższych danych można jednak ustalić kolejność wykonywania reakcji PCR mających na celu wybór sekwencji informatywnych dla par dawca / biorca.

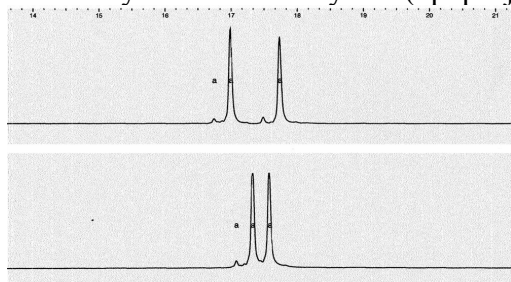
### 4.3 Wzory alleliczne uzyskiwane metodą STR-PCR

Ustalenie profilu genetycznego biorcy i dawcy przeszczepu allogenicznego metodą STR-PCR wymaga wizualizacji produktu na żelu poliakrylamidowym w sekwenatorze. Wyróżnia się trzy typy możliwych do uzyskania wzorów allelicznych:

- Biorca i dawca alloSCT są heterozygotami i żaden z alleli nie jest wspólny – cztery allele informatywne (Ryc. 7a)
- Biorca i dawca alloSCT są heterozygotami z jednym allelem wspólnym – dwa allele informatywne (Ryc. 7b)
- Biorca alloSCT jest heterozygotą a dawca homozygotą (lub odwrotnie) - jeden allele informatywny (Ryc. 7c)

#### Rycina 7. Typy wzorów allelicznych uzyskanych metodą STR-PCR

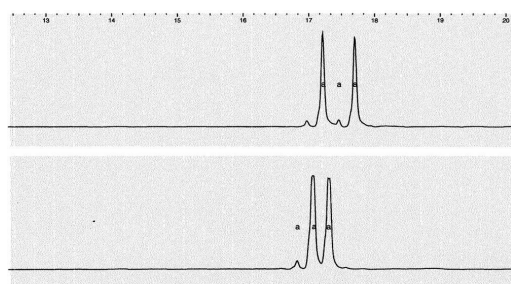
7a. Cztery allele informatywne (np. pacjent J.Sz. nr 34 locus D3S045)



BIORCA

DAWCA

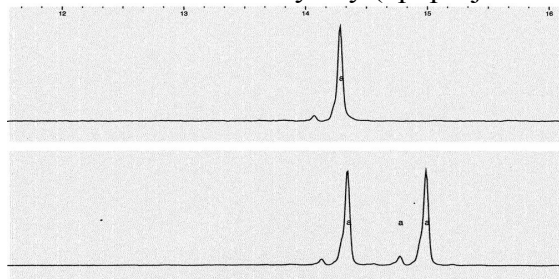
7b Dwa allele informatywne (np. pacjent P.G. nr 42 locus D22S689)



BIORCA

DAWCA

7c Jeden allele informatywny (np. pacjent W.S. nr 26 locus D16S539)



BIORCA

DAWCA

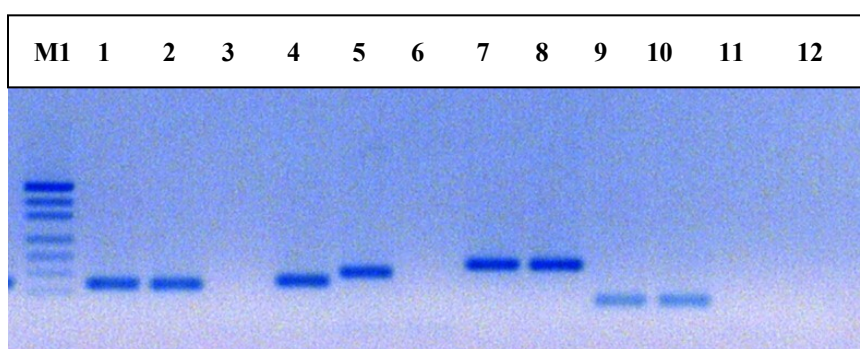
Rozkład częstotliwości występowania poszczególnych typów profili allelicznych w analizowanej populacji par biorca – dawca przedstawiał się następująco:

- układem, którego obecność stwierdzano najczęściej był układ charakteryzujący się 2 allelami informatywnymi, gdyż wykryto go w pozostałych 63 informatywnych sekwencjach STR. (84%)
- 1 allel informatywny wykryto w 7 na 75 wybranych informatywnych sekwencjach STR (9,3%) – był to allel informatywny dla dawcy lub dla biorcy
- 4 allele informatywne odnaleziono w 5 na 75 wybranych informatywnych sekwencjach STR (6,7%)

#### 4.4 Typy wzorów allelicznych uzyskiwanych przy pomocy metody RQ-PCR

Druga metoda molekularna, którą zastosowano do monitorowania kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego była oparta na ilościowej reakcji PCR przeprowadzanej w czasie rzeczywistym (RQ-PCR). Metoda ta wymagała również wybrania na drodze empirycznej dla każdej pary biorca / dawca dwóch informatywnych sekwencji (po jednej dla biorcy i dla dawcy alloSCT) o dwuallelicznym polimorfizmie. W tym celu przeprowadzono jakościową reakcję PCR a produkt amplifikacji wizualizowano w czasie rozdziału elektoroforetycznego w 2% żelu agarozowym w obecności bromku etydydy. Na Rycinie 8 przedstawiono przykładowy rozdział elektroforetyczny mający na celu ustalenie profilu genetycznego dla pacjentki L.J. (nr 33).

**Rycina 8. Przykładowy profil genetyczny ustalony metodą RQ-PCR**



Na żelu agarozowym uwidoczniło trzy typy układów allelicznych. W pozycji 1 i 2 przedstawiono sekwencje odpowiadające *locus* S01aFaR. Zarówno u biorcy (pozycja 1) jak i u dawcy (pozycja 2) stwierdzono obecność tego allelu – powyższa sekwencja nie jest więc sekwencją informatywną. Analogiczną sytuacją zaobserwowano w *loci* S04aFbR (pozycja 7 reprezentuje biorcę a 8 dawcę) i S05aFaR (pozycja 9 reprezentuje biorcę a pozycja 10 dawcę).

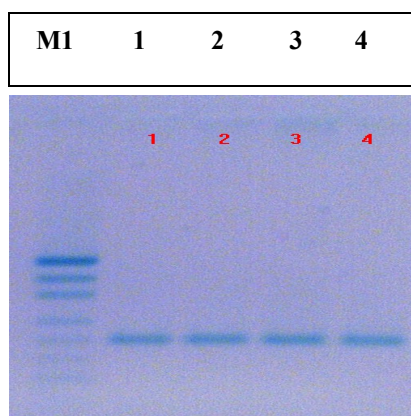
---

Przeciwnie, analiza locus S05bFaR wykazała natomiast, że ani u biorcy (pozycja 11) ani u dawcy (pozycja 12) allel nie występuje - wynika z tego, iż wymieniona sekwencja nie jest sekwencją informatywną. Informatywnym dla dawcy okazało się locus S01bFaR (pozycja 4), gdyż tylko u dawcy stwierdzono obecność allelu (biorca pozycja 3). Dla biorcy (pozycja 5) allel informatywny występuje w locus S04aFaR u dawcy (pozycja 6) nie wykryto w tym locus allelu.

#### 4.5 Kontrola jakości DNA

Równolegle do reakcji PCR służącej ustaleniu profilu genetycznego wykonywano reakcję PCR mającą na celu ocenę poprawności izolacji DNA, w której wykrywano obecność genu GAPDH. Przykładową reakcję przedstawiono na Rycinie 9.

**Rycina 9. Gen GAPDH - rozdziel elektroforetyczny w żelu agarozowym**



Na Rycinie 9 w pozycji 1 i 2 przedstawiono gen GAPDH reprezentujący materiał genetyczny odpowiednio biorcy i dawcy z pary nr 33 uzyskany przy zastosowaniu zestawu zawierającego polimerazę Fast Start Taq DNA, natomiast w pozycji 3 i 4 ten sam materiał genetyczny amplifikowany przy wykorzystaniu polimerazy typu AmpliTaq GOLD. Nie stwierdzono różnic jakościowych w uzyskanym produkcie reakcji PCR i do kolejnych reakcji ze względu na aspekt ekonomiczny używano polimerazy Fast Start Taq DNA.

#### 4.6 Informatywność sekwencji o dwuallelicznym polimorfizmie

---

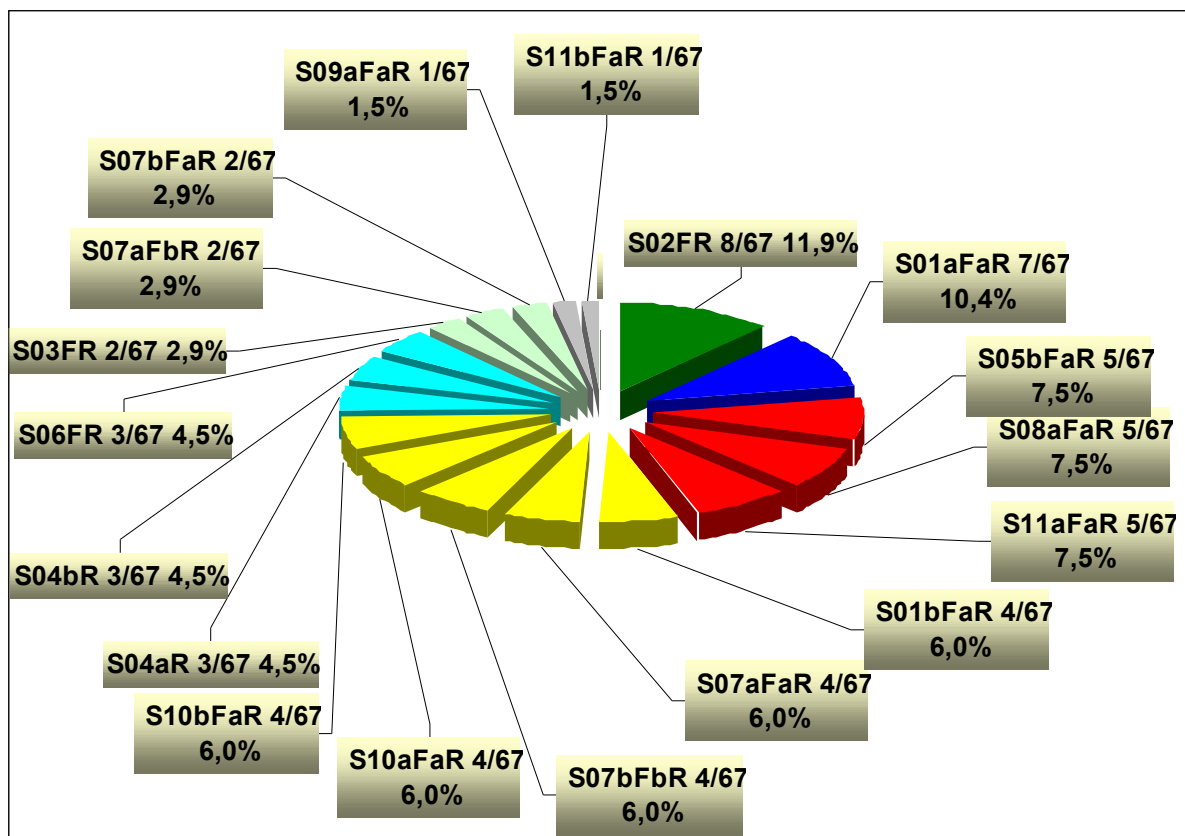
Analogiczne postępowanie jak w przypadku pacjentki nr 33, które przedstawiono w podrozdziale 4.4, przeprowadzono w przypadku wszystkich 38 par biorca / dawca włączonych do badania. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 12 (Aneks Tabele).

W oparciu o wybrany panel starterów w 67/76 przypadków (88,1% populacji badanej) udało się dokonać wyboru sekwencji informatywnych. W 11,9% przypadków nie udało się odnaleźć allelu informatywnego dla biorcy bądź dla dawcy. W takiej sytuacji monitorowanie kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego prowadzono w oparciu o jedną sekwencję informatywną. Z powyższych danych wynika, że wybrany panel sekwencji dwuallelicznych jest przydatny i pozwala na monitorowanie chimeryzmu w oparciu o 2 sekwencje w 90% przypadków natomiast w 10% monitorowanie prowadzone jest w oparciu o 1 sekwencję.

#### **4.7 Częstotliwość informatywnych sekwencji o dwuallelicznym polimorfizmie**

W badanej grupie biorców / dawców przeprowadzono ocenę informatywności dwuallelicznych sekwencji należących do wybranego na podstawie publikacji [43] panelu, która wiąże się bezpośrednio z częstotliwością występowania poszczególnych sekwencji. Na Rycinie 10 przedstawiono uzyskane wyniki.

#### **Rycina 10. Informatywność *loci* genowych o dwuallelicznym polimorfizmie**



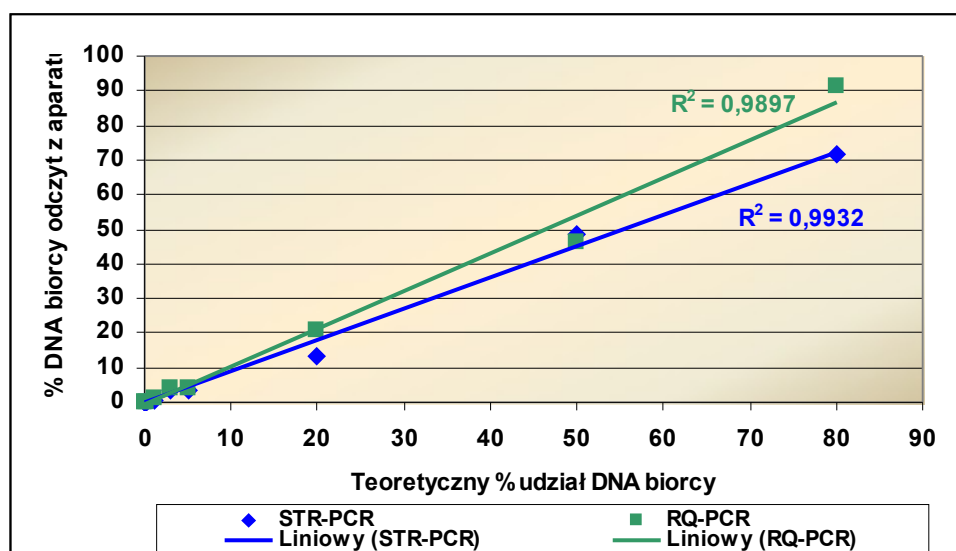
Loci o tej samej częstotliwości występowania zaznaczono takim samym kolorem. Częstotliwość przedstawiono w przeliczeniu na 67 sekwencji informatywnych.

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że najczęściej jako informatywną uznawano sekwencję S02FR (11,9%), natomiast w żadnej z par dawca/biorca nie wybrano jako informatywnej sekwencji S05aFaR, S08bFaR oraz S09aFbR. Na podstawie powyższych wyników można ustalić kolejność wykonywania reakcji PCR mających na celu wybór dwuallelicznych sekwencji informatywnych dla par dawca / biorca.

#### 4.8 Porównanie czułości reakcji STR-PCR i RQ-PCR

W celu określenia czułości metod molekularnych przy pomocy których oceniano chimeryzm hematopoetyczny wykonano szereg kolejnych rozcieńczeń materiału genetycznego biorcy w materiale genetycznym dawcy. Następnie przeprowadzono amplifikację utworzonych mieszanych chimer hematopoetycznych i odczytano uzyskane wyniki, które zestawiono w Tabeli 13 (Aneks Tabela) i na Rycinie 11.

**Rycina 11. Czułość metod STR-PCR i RQ-PCR**

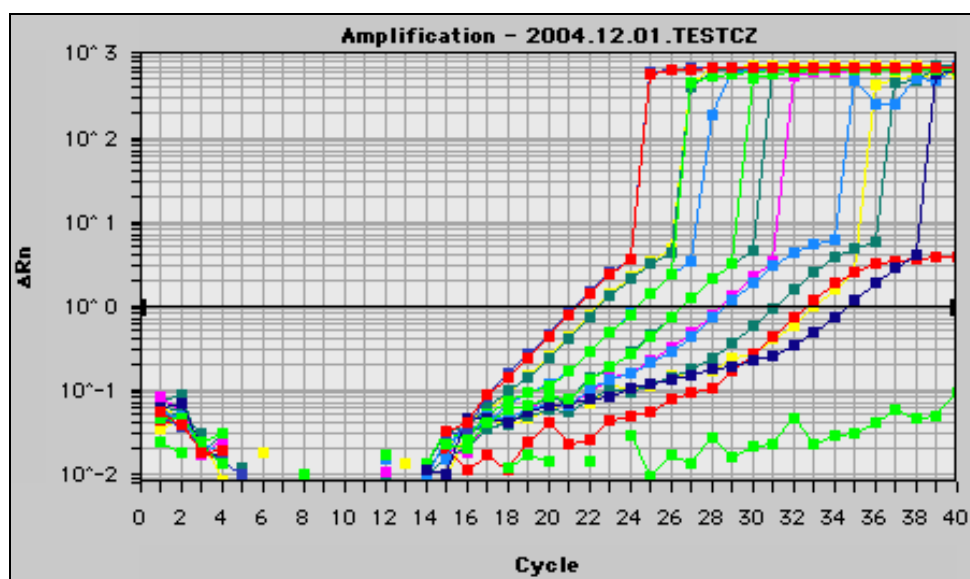


Z danych przedstawionych w Tabeli 13 wynika, że metoda RQ-PCR charakteryzuje się większą czułością, daje ona bowiem możliwość wykrycia resztkowego genotypu na poziomie 0,0125%. Na Rycinie 12 przedstawiono wykres obrazujący przyrost ilości produktu reakcji PCR w czasie (każda z reakcji wykonana w dublecie). Poszczególne krzywe, patrząc od lewej, odpowiadają malejącej ilości materiału genetycznego znajdującego wyjściowo w próbce wyrażonego jako zawartość procentowa. I tak pierwsza z nich odpowiada 100% zawartości materiału np. biorcy w badanej próbce, a ostatnia 0,0125%. Dla jasności obrazu nie przedstawiono na tym wykresie przebiegu amplifikacji genu GAPDH dla każdego z powyższych rozcieńczeń. Wyniki uzyskiwane w reakcji ilościowej uznawano jako pozytywne, gdy zawierały się w granicach 20 – 35 cyklu. Metoda ilościowej oceny udziału hematopoezy dawcy wykazuje także dużą zgodność z teoretycznym udziałem materiału genetycznego w danym rozcieńczeniu. Czułość metody STR-PCR przyjęto na poziomie 5%. Wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu metody półilościowej (STR-PCR) podobnie jak w przypadku metody ilościowej (RQ-PCR) wykazują zgodność z teoretycznym udziałem materiału genetycznego w poszczególnych rozcieńczeniach.

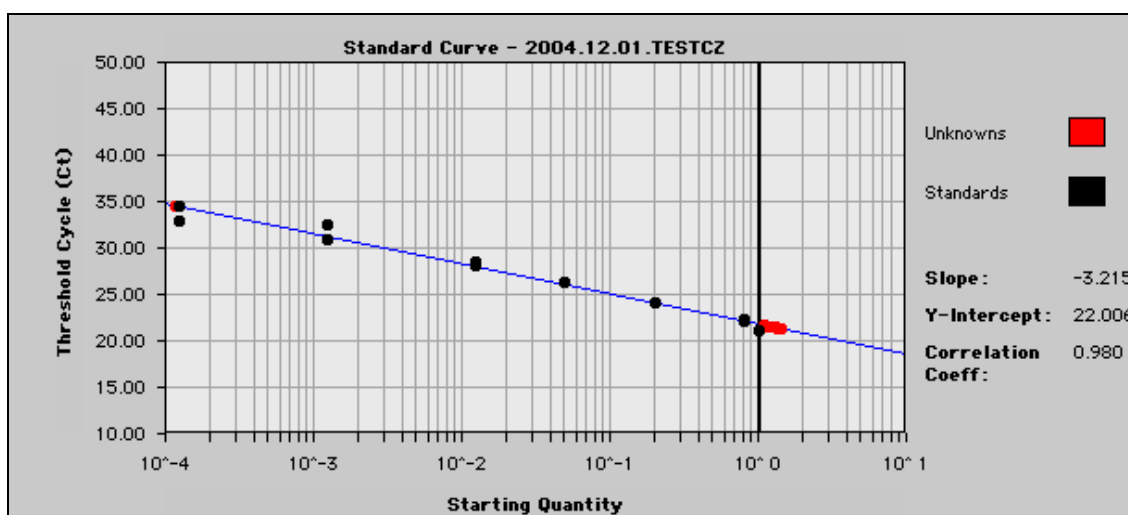
Na Rycinie 13 przedstawiono przykładową krzywą standardową wykorzystywaną do oceny ilości produktu w próbce badanej. Wartość współczynnika nachylenia prostej uzyskana w tej reakcji  $s = -3,215$  natomiast współczynnik korelacji  $R^2 = 0,98$ . Uśredniona wartość współczynnika  $s$  wyniosła  $s = -3,37 \pm 0,2$ , co odpowiada wydajności reakcji ( $E$ ) na poziomie  $E = 0,97$ .



Rycina 12 Wykres obrazujący przebieg amplifikacji produktu w czasie rzeczywistym – wydruk z aparatu



Rycina 13 Krzywa standardowa dla metody RQ-PCR – wydruk z aparatu



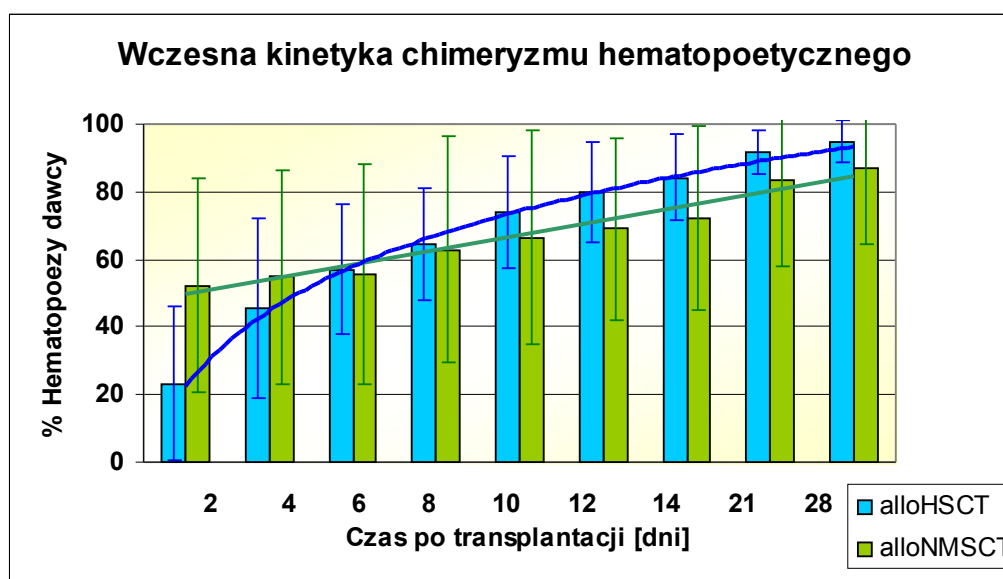
Przeprowadzono porównanie wyników oceny chimeryzmu hematopoezy uzyskanych przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR. Obserwowane różnice nie miały cech istotności statystycznej. Średnia różnica w wynikach w grupie pacjentów poddanych alloHSCT wyniosła  $2,7 \pm 1,14$  (mediana  $1,3 \pm 1,17$ ), natomiast w grupie pacjentów po alloNMSCT wyniosła  $1,69 \pm 4,86$  (mediana  $1,48 \pm 2,59$ ), a wyższy odsetek udziału dawcy w krwiotworzeniu stwierdzano przy pomocy metody ilościowej.

Na podstawie powyższych danych stwierdzono, że metoda RQ-PCR jest metodą o większej czułości niż metoda STR-PCR.

#### 4.9 Wczesna kinetyka chimeryzmu hematopojezy oceniana przy pomocy metody STR-PCR

Wczesną ocenę chimeryzmu hematopoetycznego prowadzono w oparciu o sekwencje STR o wysokim stopniu polimorfizmu do +30 doby po allogenicnej transplantacji komórek hematopoetycznych. Badanie poziomu chimeryzmu hematopoetycznego prowadzono w tym okresie co drugi dzień począwszy od doby +2 do doby +14 a następnie co tydzień do doby +28. Oceny chimeryzmu dokonywano we krwi obwodowej. W Tabelach 14a i 14b (Aneks Tabele) przedstawiono uzyskane wyniki, które są średnią arytmetyczną z wartości uzyskanych z dwóch badanych sekwencji STR (powyższa uwaga nie dotyczy pacjentki G.M nr 30.). Zamieszczone wartości odpowiadają procentowemu udziałowi hematopojezy dawcy w całości hematopojezy zachodzącej w organizmie biorcy.

Rycina 14. Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego



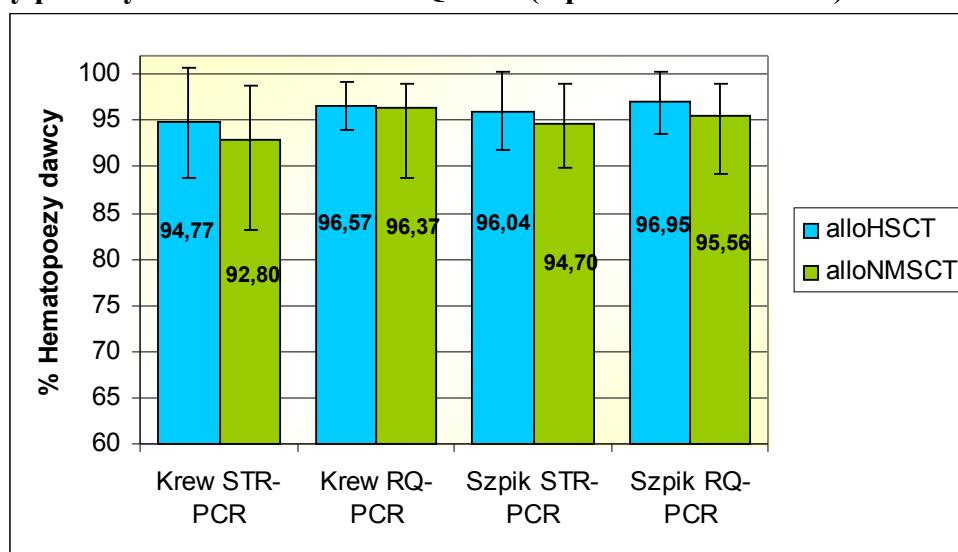
Z powyższych danych wynika, że wczesne zmiany chimeryzmu hematopoetycznego w grupie pacjentów podanych alloHSCT przebiegają zgodnie z zależnością logarytmiczną ( $R^2=0,996$ ) natomiast w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT są zgodne z zależnością liniową ( $R^2=0,959$ ). Przy wykorzystaniu testu t-Studenta stwierdzono, że istotnie statystycznie różnice w poziomie wczesnego chimeryzmu hematopoetycznego pomiędzy grupami pacjentów poddanych alloNMSCT i alloHSCT występują tylko w 2 doby po allogenicnej transplantacji ( $p=0,0048$ ).

Uzyskane wyniki dowodzą, że różnice w przebiegu wczesnych zmian chimeryzmu hematopoetycznego najprawdopodobniej zależą od intensywności zastosowanych warunków kondycjonowania.

#### 4.10 Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i we krwi w 30 dobie po transplantacji

W niniejszej pracy jako punkt czasowy kończący monitorowanie wczesnych zmian chimeryzmu hematopoetycznego traktowano 30 dobę po allogenicznej transplantacji. Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oznaczano w szpiku kostnym przy pomocy obu metod po raz pierwszy w 30 dobie po transplantacji. W Tabelach 15a i 15b (odpowiednio dla pacjentów poddanych alloHSCT i alloNMSCT) (Aneks Tabele) przedstawiono wyniki oceny chimeryzmu hematopoetycznego przedstawionego jako procentowy udział hematopoezy dawcy w całkowitej hematopoezie zachodzącej w organizmie biorcy.

**Rycina 15. Poziom chimeryzmu u pacjentów poddanych alloHSCT oraz alloNMSCT oceniony przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR (szpik vs krew doba 30)**



Analiza powyższych wyników przy pomocy testu t-Studenta nie wykazała istotności statystycznej różnic w żadnym z wybranych układów.

Uzyskane wyniki sugerują, że rodzaj przygotowania pacjenta do allogenicznej transplantacji (kondycjonowanie) nie ma wpływu na poziom chimeryzmu w 30 dobie po transplantacji. Na tym etapie nie ma także różnic w wynikach oceny chimeryzmu uzyskanych przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR. Porównanie wartości uzyskanych we krwi i szpiku wskazuje, że badania z wykorzystaniem krwi są przydatne w tym okresie po transplantacji.

---

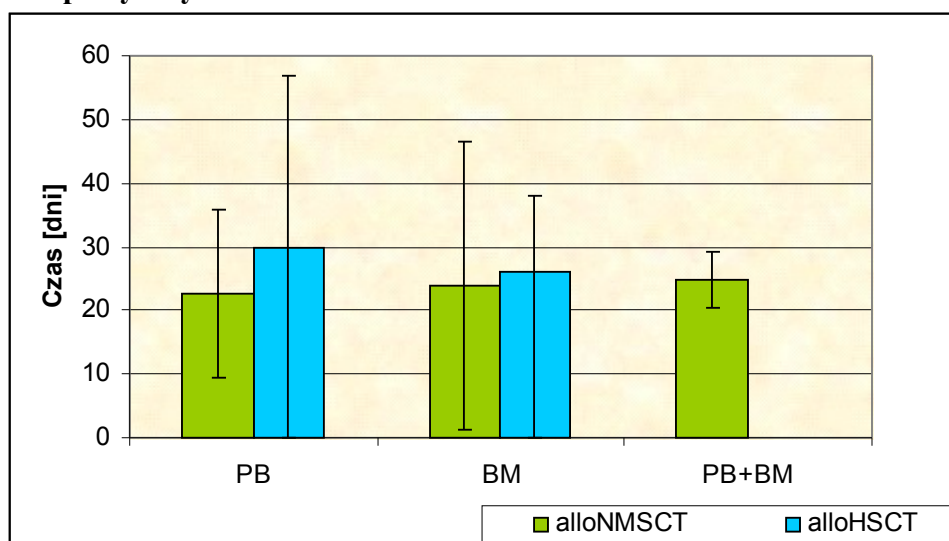
#### 4.11 Wszczepienie molekularne

Na podstawie danych uzyskanych w czasie monitorowania wczesnych zmian chimeryzmu hematopoetycznego dla każdego z pacjentów określono dobę, w której chimeryzm hematopoetyczny osiągnął poziom pozwalający na stwierdzenie wszczepienia molekularnego. Ze względu na czułość metody STR-PCR (5%) za moment wszczepienia molekularnego uznano dzień, w którym udział hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu zachodzącym w organizmie biorcy osiągnął poziom 95%. Dokonano także porównania czasu wszczepienia molekularnego ze wszczepieniem hematologicznym, dla którego kryterium stanowi odbudowa hematologiczna wyrażona ilością neutrofilii (powyżej 500 /  $\mu$ l) oraz płytek krwi (powyżej 20 000 /  $\mu$ l). Wyniki przedstawiono w tabelach 16a oraz 16b (Aneks Tabele).

Przy pomocy testu t-Studenta przeprowadzono analizę czasu wszczepienia molekularnego względem czasu wszczepienia hematologicznego. Nie stwierdzono istotnych różnic między czasem wszczepienia molekularnego wyrażonego jako doba osiągnięcia całkowitego chimeryzmu dawcy a czasem wszczepienia hematologicznego w żadnym z wybranych układów (pacjenci poddani alloHSCT, alloNMSCT oddzielnie i zbiorczo oraz w grupach wydzielonych na podstawie układu płci). Odmiennie przedstawiała się sytuacja gdy jako dobę wszczepienia molekularnego przyjęto pierwszy dzień, w którym stwierdzono dominację alleli dawcy. Wówczas wszczepienie molekularne znamienne statystycznie poprzedzało wystąpienie wszczepienia hematologicznego ( $p = 1,44 \times 10^{-12}$  dla alloHSCT;  $p = 2,12 \times 10^{-6}$  dla alloNMSCT).

Przeprowadzono także analizę różnic w czasie wszczepienia molekularnego w zależności od źródła komórek hematopoetycznych użytych do transplantacji jak i ilością komórek CD34+ w materiale przeszczepowym, przeliczonych na kilogram masy ciała biorcy. Poszukiwanie różnic we wszczepieniu molekularnym komórek hematopoetycznych pochodzących ze szpiku kostnego, krwi obwodowej lub obu tych źródeł równocześnie przeprowadzono w grupie pacjentów: łącznie po alloNMSCT i alloHSCT, oddzielnie w obu tych grupach oraz pomiędzy pacjentami, u których komórki hematopoetyczne pochodziły z tego samego źródła ale różnił ich rodzaj przeszczepienia. Rezultaty badań przedstawiono na Rycinie 16. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między czasem wszczepienia molekularnego wyrażonego w dniach, a rodzajem źródła komórek hematopoetycznych, niezależnie od przyjętego układu.

**Rycina 16. Czas wszczepienia molekularnego a rodzaj źródła macierzystych komórek hematopoetycznych**

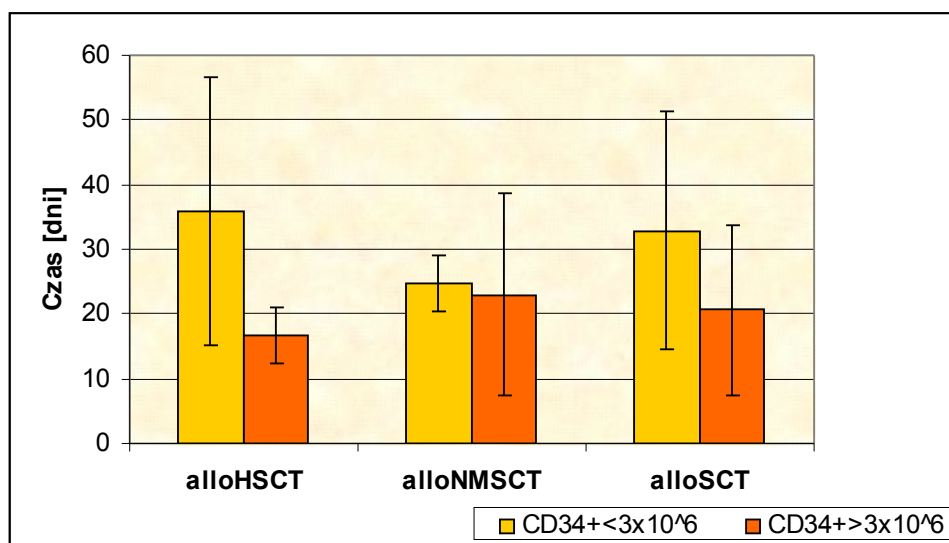


PB – krew obwodowa, BM –szpik kostny

W celu przeprowadzenia oceny różnic we wszczepieniu molekularnym między pacjentami, którym niezależnie od źródła materiału przeszczepowego, podano różną ilość komórek CD34+ podzielono ich na dwie grupy. Grupa 1 obejmowała pacjentów, którzy otrzymali  $3 \times 10^6$  lub mniej komórek CD34+ na kilogram masy ciała biorcy a do grupy 2 zaliczono pacjentów, którym podano więcej niż  $3 \times 10^6$  komórek CD34+ na kilogram masy ciała biorcy. Różnice między grupą 1 i 2 analizowano oddzielnie wśród pacjentów poddanych alloNMSCT i alloHSCT oraz łącznie w obu typach transplantacji (alloSCT).

Wśród pacjentów poddanych alloSCT i alloHSCT stwierdzono istotne statystycznie szybsze wszczepienia molekularne w grupach 2 – dla alloHSCT średnio dzień  $16,8 \pm 4$  versus  $35,7 \pm 20$ ; mediana 14 dzień versus 28 ( $p = 0,013$ ), dla alloSCT średnio dzień  $20,7 \pm 13$  versus  $32,9 \pm 18$ ; mediana 21 dzień versus 28) ( $p = 0,021$ ). W grupie pacjentów po alloNMSCT nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Uzyskane wyniki przedstawiono graficznie na Rycinie 17.

**Rycina 17. Czas wszczepienia molekularnego a ilość podanych komórek CD 34+**



Uzyskane wyniki wskazują, że wszczepienie molekularne jest uzyskiwane szybciej w grupie pacjentów, którym w materiale przeszczepowym podano większą niż  $3 \times 10^6$ /kg wagi ciała ilość komórek CD34+.

#### **4.12 Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej 30 doby po transplantacji**

W czasie całego okresu potransplantacyjnego zarówno u pacjentów poddanych alloHSCT jak i alloNMSCT monitorowano chimeryzm hematopoetyczny metodą STR-PCR. Pomiary poziomu chimeryzmu przeprowadzono w następujących odstępach czasowych: 60, 90, 120, 150, 180, 270, 360, 540 oraz 720 doba po allogenicznej transplantacji. Wyniki badań przedstawiono w Tabelach 17a i 17b (Aneks Tabele). Podane wartości odpowiadają średniej arytmetycznej uzyskanej z dwóch loci STR wyrażonej jako udział hematopoezy dawcy i uwzględniają poziom chimeryzmu we krwi obwodowej i szpiku kostnym. Z badania wyłączono pacjenta TG (nr 7), gdyż zmarł on w 15 dobie po transplantacji

Ocenę chimeryzmu hematopoetycznego przeprowadzono także przy pomocy metody ilościowej w tych samych punktach czasowych jak w przypadku metody STR-PCR. Oznaczenia wykonywano w szpiku kostnym i krwi obwodowej. Wyniki przedstawiono w Tabelach 18a i 18b (Aneks Tabele)

Przy pomocy testu t-Studenta sprawdzono istotność statystyczną różnic w wartościach chimeryzmu hematopoetycznego uzyskiwanych przy pomocy metody ilościowej i półilościowej. Analizę przeprowadzono oddzielnie w grupie pacjentów poddanych transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem mieloablacyjnym i niemeloablacyjnym. Nie

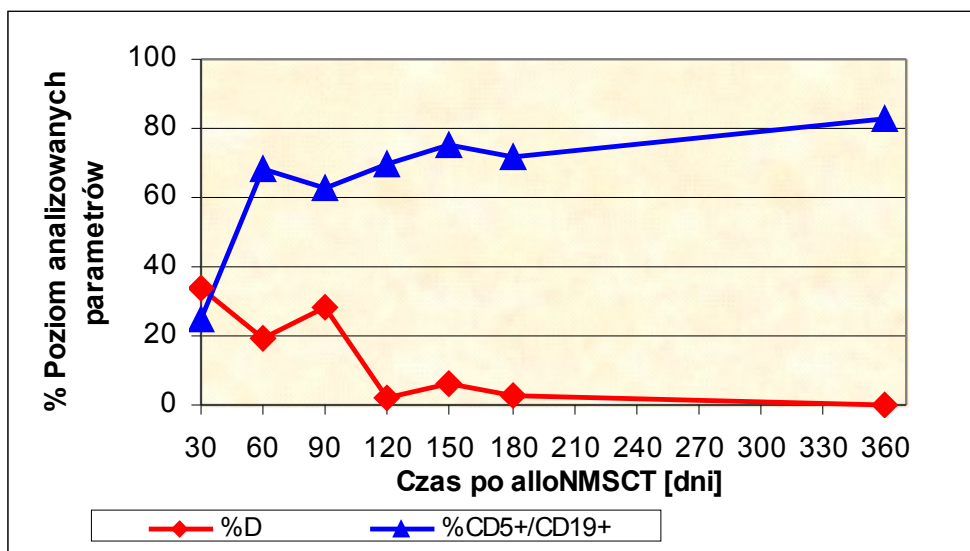
---

stwierdzono statystycznie istotnych różnic zaobserwowano jednak trend wskazujący, że zarówno w grupie pacjentów poddanych alloHSCT jak i alloNMSCT, w poszczególnych dniach po transplantacji, uzyskano wyniki wskazujące na większy udział hemopoezy dawcy w całkowitym krwiotworzeniu ocenionej przy pomocy metody ilościowej niż przy pomocy metody półilościowej.

#### 4.13 Porównanie metod STR-PCR i RQ-PCR z innymi metodami laboratoryjnymi

Jednym ze sposobów umożliwiających śledzenie choroby resztkowej u pacjentów poddanych zarówno standardowej chemioterapii jak i allogeniczej transplantacji komórek hematopoetycznych jest ocena immunofenotypu komórek układu krwiotwórczego i immunologicznego. Do tego celu stosuje się metodę cytometrii przepływową. Podstawowym warunkiem prawidłowego monitorowania choroby resztkowej jest znajomość immunofenotypu ekspresji molekuł powierzchniowych, który ocenia się w momencie diagnozy. W poniższym podrozdziale przedstawiono porównanie wyników chimeryzmu hematopoetycznego uzyskanych metodami STR-PCR i RQ-PCR oraz wyników monitorowania choroby resztkowej otrzymanych przy pomocy metody cytometrii przepływową. Przedstawiony przykład dotyczy pacjentki AN (nr 39) cierpiącej na B-komórkową przewlekłą białaczkę limfatyczną (B-CLL). Dla tego typu schorzenia charakterystyczna jest obecność limfocytów B o immunofenotypie CD5+/CD19+. Pacjentka ta została poddana allogeniczej transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem niemieloablacyjnym. Przykład dotyczący wyników monitorowania chimeryzmu przy pomocy metody STR-PCR zobrazowano na Rycinie 18 (oraz Tabela 17b Aneks Tabele).

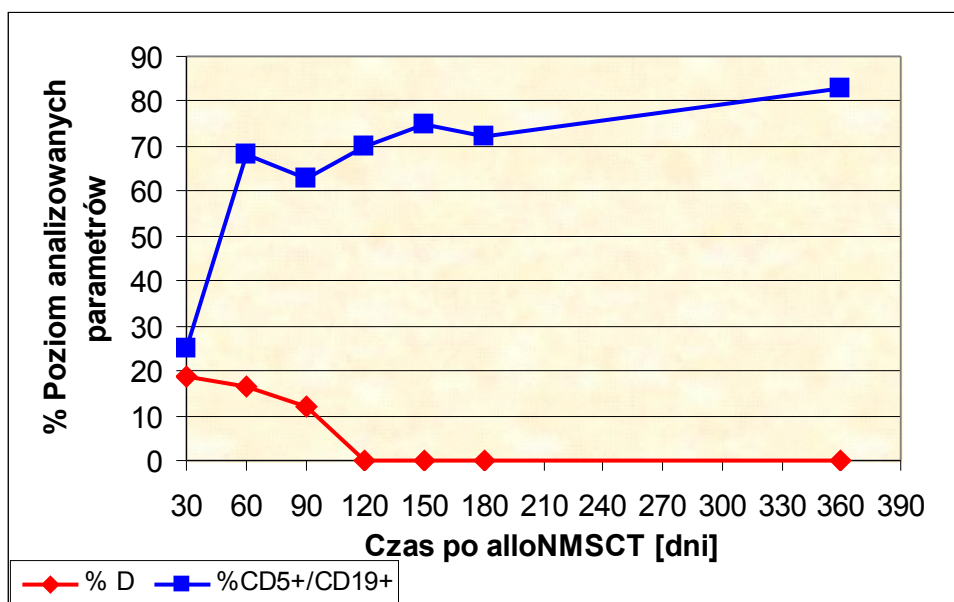
**Rycina 18. Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oznaczonego przy pomocy metody STR-PCR a obecność komórek CD5+/CD19+**



Na Rycinie 18 linia czerwona odpowiada zmianom chimeryzmu hematopoetycznego (odsetek hematopoezy dawcy) w szpiku kostnym, natomiast linia zaznaczona kolorem niebieskim przedstawia ilość komórek szpiku kostnego o immunofenotypie CD5+/CD19+. Po pierwszej alloNMSCT nie stwierdzono wszczepienia molekularnego. Maksymalny poziom chimeryzmu dawcy wystąpił w dobie 30 i wynosił 36,2%. W tej samej dobie stwierdzono także minimalny poziom udziału procentowego klonu komórkowego o immunofenotypie CD5+/CD19+ (25%). Spadkowi udziału hematopoezy dawcy w całkowitym krwiotworzeniu biorcy towarzyszy wzrost ilości komórek CD5+/CD19+. W 120 dobie po alloNMSCT stwierdzono utratę przeszczepu (poziom chimeryzmu dawcy spadł do 2,2%). W 404 dobie po alloNMSCT podjęto decyzję o przeprowadzeniu drugiej alloNMSCT.



**Rycina 19. Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oznaczonego przy pomocy metody RQ-PCR a obecność komórek CD5+/CD19+**



Podobne zależności obserwowano w trakcie analizy przy użyciu metody RQ-PCR (Rycina 19, Tabela 18b Aneks Tabele). Przy pomocy metody RQ-PCR nie stwierdzono wszczepienia molekularnego. Największy udział hemopoetycy dawcy w krwiotworzeniu biorcy w 30 dobie po transplantacji wyniósł 18,7%. Udział hemopoetycy dawcy stopniowo zmniejszał się aż zera w dobie 120, co wskazywało na utratę przeszczepu.

Zarówno w przypadku zastosowania metody STR-PCR jak i RQ-PCR istniała duża zgodność śledzonych zmian chimeryzmu hematopoetycznego dawcy i ilości komórek CD5+/CD19+ wykrytych w cytometrii przepływowej.

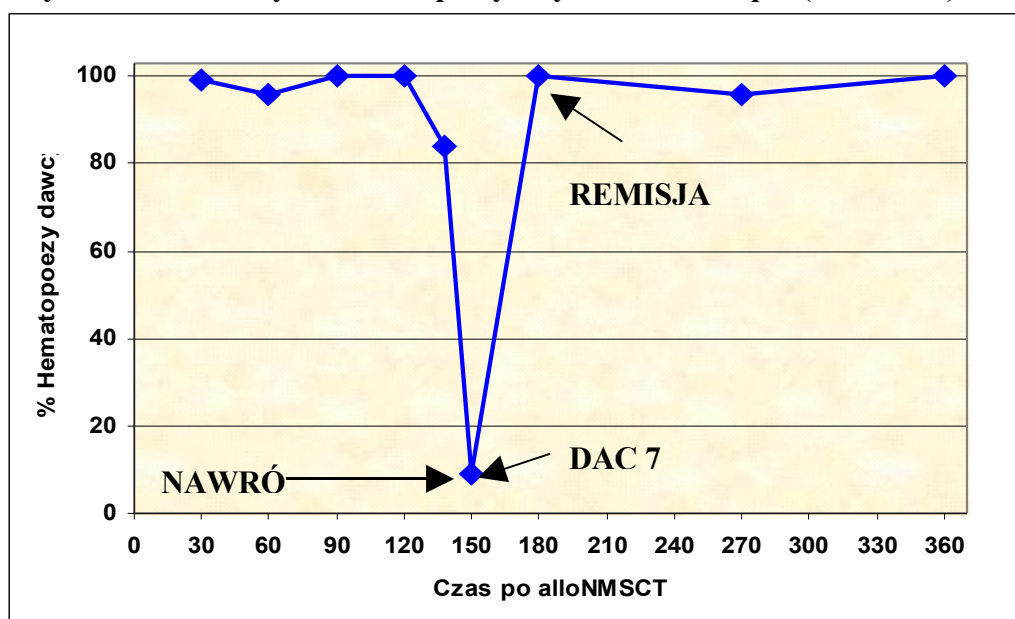
#### **4.14 Przykłady kształtowania się chimeryzmu hematopoetycznego po allogeniczej transplantacji monitorowanego przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR**

##### **4.14.1 Wpływ chemioterapii na zmiany chimeryzmu hemopoetycznego**

Monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego nie jest tożsame z oceną choroby resztkowej. W zdecydowanej większości przypadków pojawienie się mieszanego chimeryzmu po występującym CC jest jednak równoznaczne z nawrotem choroby podstawowej. Na Rycinie 20 (oraz w Tabeli 17b Aneks Tabele) przedstawiono kinetykę chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentki AJ (nr 28) poddanej alloNMSCT. Do 120 doby po transplantacji obserwowano

całkowity chimeryzm dawcy. Pierwszy sygnał o załamaniu CC pojawił się w dobie 138 po allogenicznej transplantacji, kiedy to zaobserwowano utratę chimeryzmu dawcy i pojawienie się mieszanego chimeryzmu na poziomie 84,1% chimeryzmu dawcy. W dobie 150 doszło do gwałtownego obniżenia poziomu chimeryzmu dawcy do ilości 8,8%. Rycina 21 przedstawia przebieg równoczesnego monitorowania choroby resztkowej metodą RT-PCR. Badano obecność transkryptu aml/eto występującego u chorych na ostrą białaczkę szpikową podtyp M2 (Ryc. 21 A). Po okresie remisji molekularnej (Ryc.21 B) prążek pozytywny pojawił się w wewnętrznej reakcji PCR w 88 dobie. Analiza wykonana w dobie 147 (Ryc.21 D) wykazała przyrost ilości transkryptu – produkt pozytywny pojawił się w zewnętrznej reakcji PCR. Po zastosowaniu chemioterapii reindukującej według schematu DAC7 doszło do ponownego pojawienia się całkowitego chimeryzmu dawcy w 180 dobie jednocześnie badaniem RT-PCR stwierdzono remisję molekularną (Ryc.21 E).

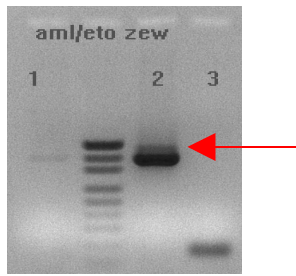
**Rycina 20. Chimeryzm hematopoetyczny a chemioterapia (STR-PCR)**



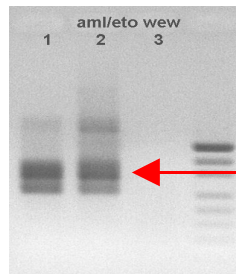
**Rycina 21. Monitorowanie obecności transkryptu aml/eto metodą RT-PCR (p. AJ)**

**A. Diagnostyka VIII 2003. Transkrypt widoczny w reakcji zewnętrznej**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 2)

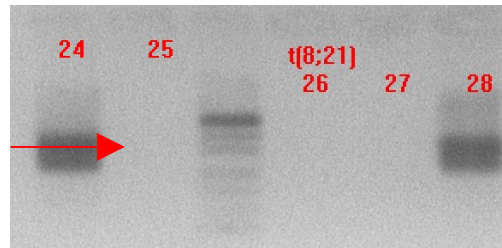
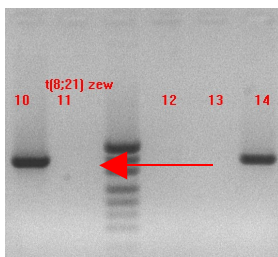


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 2)



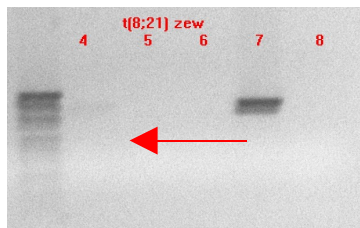
**B. 31 doba po allogenicznej transplantacji (V 2004). Remisja molekularna brak transkryptu.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 11) Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 25)

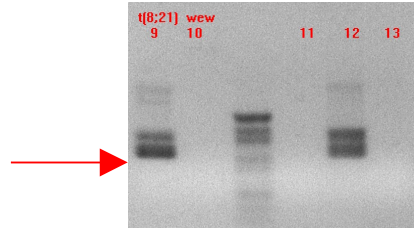


**C. 88 doba po allogenicznej transplantacji (VII 2004). Utrata remisji molekularnej – transkrypt obecny w reakcji wewnętrznej.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 4)

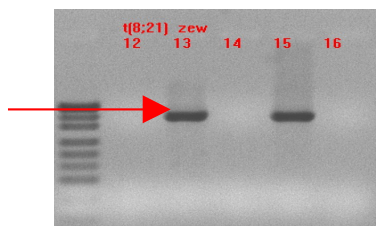


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 9)

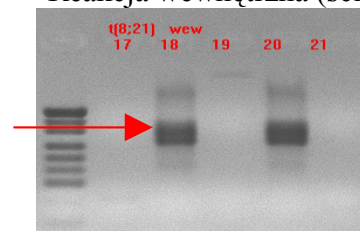


**D. 147 doba po allogenicznej transplantacji (IX 2004). Nawrót. Obecność transkryptu w reakcji zewnętrznej. MC na poziomie 8,8% udziału dawcy (STR-PCR) lub 20,8% (RQ-PCR). Podanie DAC7**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 13)

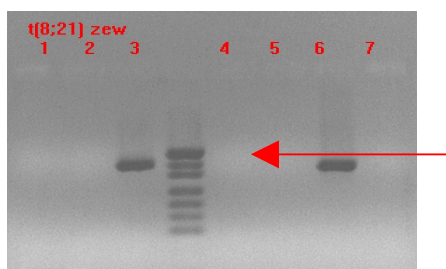


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 18)

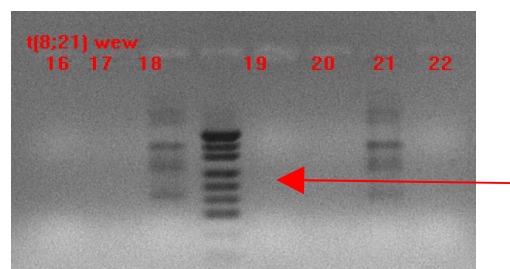


**E. 200 doba po allogenicznej transplantacji (XI 2004). Remisja molekularna – brak obecności transkryptu. Całkowity chimeryzm dawcy.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 4)

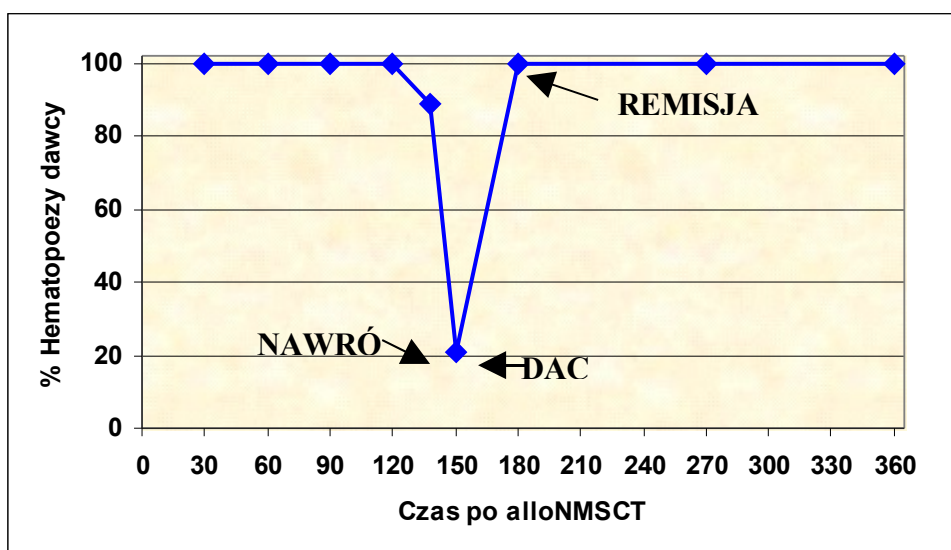


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 19)



Wyniki uzyskane przy pomocy metody RQ-PCR były zgodne z otrzymanymi przy pomocy metody STR-PCR. Utrata chimeryzmu dawcy i wzrost udziału krwiotworzenia biorcy występowały równolegle z utratą remisji molekularnej i na odwrót wzrost chimeryzmu dawcy wskazywał na uzyskanie remisji molekularnej. Jediną różnicą było to, że w badaniu wykonanym przy pomocy RQ-PCR w 150 dobie poziom chimeryzmu wskazywał na 20,8% udział dawcy w krwiotworzeniu. Ta różnica w poziomie chimeryzmu (8,8% STR-PCR) wynika z ograniczeń metody STR-PCR, które szerzej zostaną omówione w Dyskusji. Zmiany chimeryzmu przedstawiono na Rycinie 22 (oraz w Tabeli 18b, Aneks Tabele).

**Rycina 22. Chimeryzm hematopoetyczny a chemioterapia (RQ-PCR)**

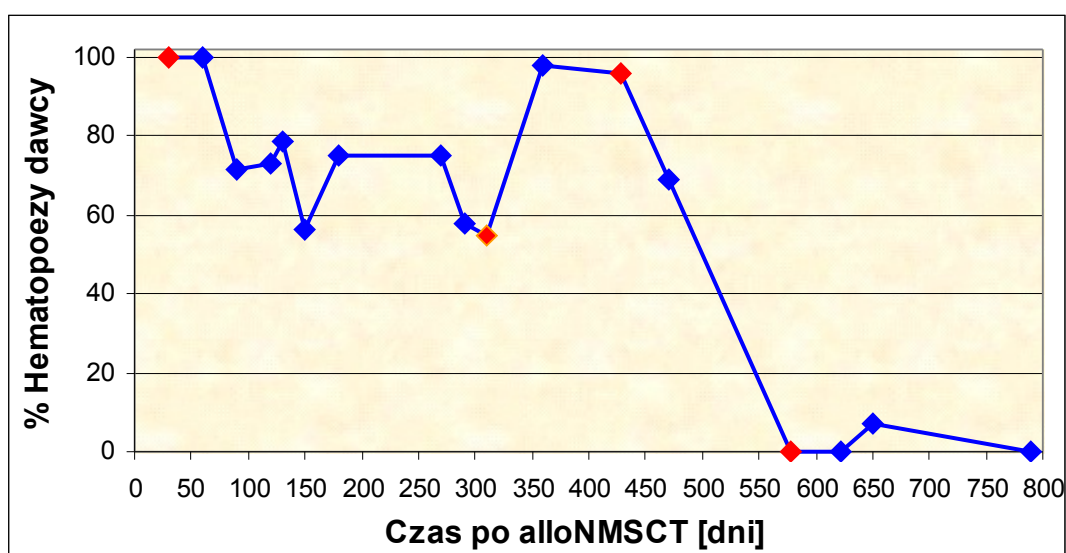


#### 4.14.3 Powrót hematopoezy o genotypie biorcy bez towarzyszącego mu nawrotu choroby podstawowej

W podrozdziale 4.14.1 przedstawiono przykład, w którym wyniki uzyskiwane podczas monitorowania choroby resztkowej były zgodne z wynikami uzyskiwanymi w czasie oceny zmian chimeryzmu hematopoetycznego. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego nie przekładają się w bezpośredni sposób na występowanie lub brak choroby resztkowej. Przykładem doskonale ilustrującym ten brak zależności jest przypadek pacjentki GM (nr 27) poddanej allogenicznej transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem o zmniejszonej toksyczności z powodu AML M4. U pacjentki wszczepienie molekularne wykryte przy pomocy metody STR-PCR nastąpiło w 25 dobie po alloNMSCT. Całkowity chimeryzm dawcy utrzymywał się na poziomie 100% do 60 doby po alloNMSCT włącznie (Rycina 23 Tabela 17b,

Aneks Tabele). Uzyskane rezultaty zostały potwierdzone przez wyniki badania chimeryzmu hematopoetycznego wykonane przy pomocy metody FISH (w 60 dobie po alloNMSCT udział hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu wyniósł 95,7%). Następne badania prowadzone przy pomocy metody STR-PCR wykazały, że u pacjentki następuje utrata CC czemu towarzyszyło pojawienie się MC na poziomie 75 – 85% hematopoezy dawcy, a w dobie 150 nastąpiło zmniejszenie udziału dawcy w krwiotworzeniu do poziomu 56,6%. Oznaczenie chimeryzmu hematopoetycznego wykonane w 271 dobie po transplantacji wykazało udział chimeryzmu dawcy w krwiotworzeniu na poziomie 55%, co mogłoby sugerować nawrót choroby podstawowej. Badanie przy pomocy metody STR-PCR wykazało w 426 dobie powrót do CC, w badanym materiale stwierdzono obecność chimeryzmu dawcy na poziomie 96%. Doba 525 po allogenicznej transplantacji przyniosła informację o całkowitej utracie przeszczepu. Poziom udziału hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu w badaniu STR-PCR został oceniony na 0%. W kontrolnym badaniu wykonanym w 578 dobie po alloNMSCT w szpiku kostnym przy pomocy metody cytometrii przepływowej potwierdzono remisję hematologiczną (odsetek mieloblastów o fenotypie CD29+/117+31- wyniósł 0,5%). Sugeruje to, że wykryta w czasie badania chimeryzmu hematopoeza o genotypie biorcy nie miała podłoża nowotworowego.

**Rycina 23. Utrata przeszczepu bez nawrotu choroby podstawowej (STR-PCR) Pacjentka GM**

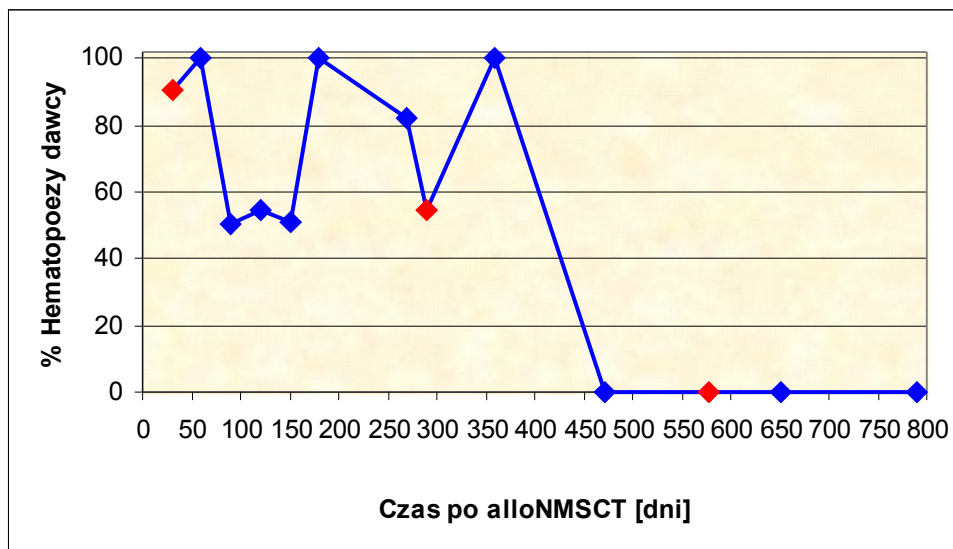


Wartości zaznaczone na czerwono odpowiadają punktom czasowym, w których wykonano ocenę rozmazu szpiku



Wyniki monitorowania kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy ilościowej metody w sposób graficzny przedstawiono na Rycinie 24.

**Rycina 24. Utrata przeszczepu bez nawrotu choroby podstawowej (RQ-PCR)**



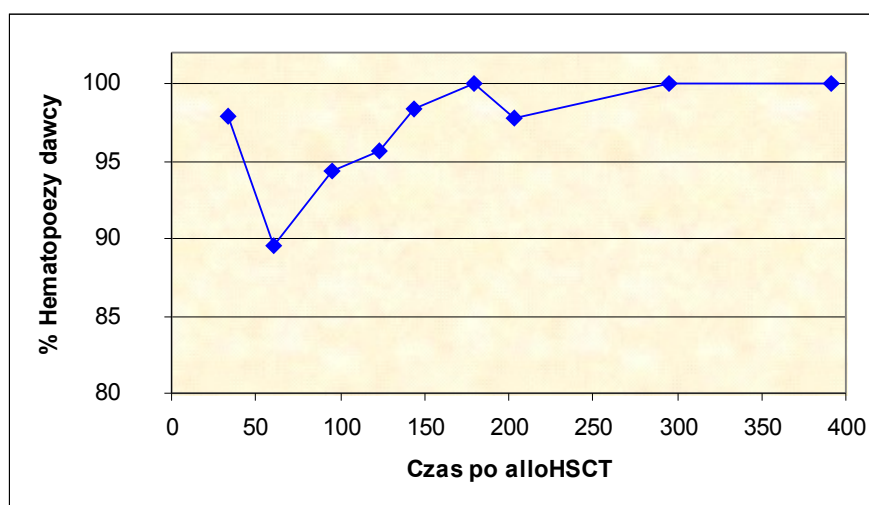
Przy pomocy metody RQ-PCR w 27 dobie po allogenicznej transplantacji nie stwierdzono u pacjentki GM wszczepienia molekularnego, (poziom chimeryzmu hematopoetycznego wynosił wówczas 90,5%). Uzyskane wyniki (Tabela 18b, Aneks Tabele) korelują z wynikami uwidocznionymi w rozmazie szpiku kostnego, gdzie stwierdzono czterokrotnie zwiększony odsetek monocytów oraz zwiększony odsetek mieloblastów (Tabela 19, Aneks Tabele). Przebieg zmian chimeryzmu hematopoetycznego, był zbliżony przy użyciu obu metod jakkolwiek zaobserwowano pewne różnice. Wszczepienie molekularne oceniane przy pomocy metody RQ-PCR pojawiło się dopiero w 60 dobie po alloNMSCT. Przy użyciu metody STR-PCR stwierdzono uporczywy mieszany chimeryzm utrzymujący się aż do 271 doby natomiast w przypadku wyników uzyskanych przy pomocy metody ilościowej stwierdzono wystąpienie epizodu całkowitego chimeryzmu dawcy w 180 dobie po transplantacji. W kolejnych badaniach chimeryzmu hematopoetycznego tą metodą stwierdzono całkowitą utratę chimeryzmu dawcy aż do poziomu 0,02%. Tendencja ta utrzymała się do końca okresu monitorowania.

Przedstawione powyżej wyniki dowodzą, że oceny chimeryzmu hematopoetycznego nie można utożsamiać z monitorowaniem choroby resztkowej.

#### 4.14.3 Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjenta w remisji molekularnej

Przykładem pacjenta, który uzyskał CC potwierdzony metodą RT-PCR jest pacjentka AW (nr 18). Pacjentka ta została poddana allogenicznej transplantacji poprzedzonej mieloablacyjnym kondycjonowaniem z powodu przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Przy pomocy metody RT-PCR stwierdzono występowanie transkryptu bcr/abl w odmianie b<sub>2</sub>a<sub>2</sub> (Ryc. 26A). W 12 dobie po wykonaniu allogenicznej transplantacji uzyskano wszczepienie molekularne (Ryc. 25 Tabela 17a, Aneks Tabele). Badanie STR-PCR wykonane w 27 dobie po alloHSCT wykazało udział hematopoezy dawcy w szpiku kostnym na poziomie 97,8%. Wykonane w tym samym czasie badanie metodą RT-PCR wykazało remisję molekularną (Ryc. 26 B). W 60 dobie po transplantacji metodą STR-PCR stwierdzono utratę CC i pojawienie się w szpiku kostnym MC na poziomie 89,6% hematopoezy dawcy. W badaniu wykonanym przy pomocy metody RT-PCR stwierdzono utrzymującą się remisję molekularną (Ryc.26C). Kolejne badanie wykonane metodą STR-PCR w dobie 90 po alloHSCT przyniosło informację o zmianie MC na korzyść chimeryzmu dawcy do poziomu 94,4%, co stanowi graniczną wartość CC. Wynik uzyskany metodą RT-PCR ponownie wskazywał na utrzymującą się remisję molekularną (Rycina 26D). Pomiędzy dobą 90 a 180 u pacjentki AW chimeryzm hematopoetyczny kształtował się na poziomie CC i w dobie 180 wynosił 97,8% hematopoezy dawcy. Wykonane wówczas badanie molekularne ponownie wskazało na remisję molekularną (Ryc. 26E). Kolejne badania wykonane po ponad roku obserwacji wskazuje na utrzymujący się CC i remisję molekularną.

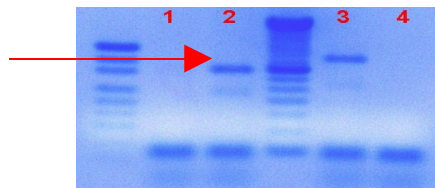
**Rycina 25 Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentki AW (STR-PCR)**



**Rycina 26 Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp b<sub>2</sub>a<sub>2</sub> metodą RT-PCR (pacjentka AW)**

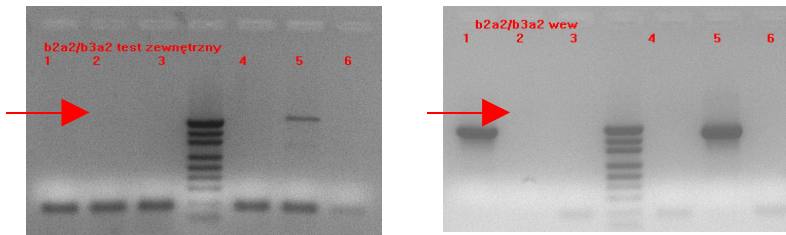
**A. Diagnoza**

Jednoetapowa reakcja Multipleks (ścieżka nr 2). Transkrypt widoczny w reakcji zewnętrznej.



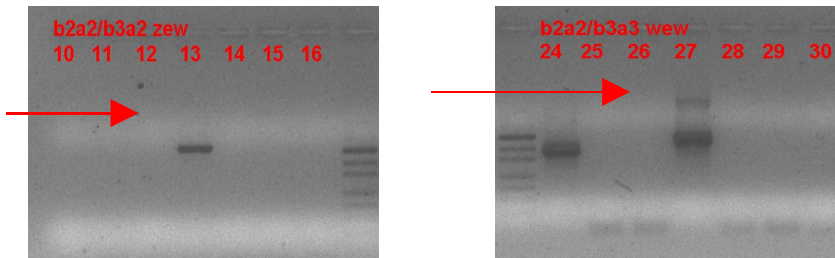
**B. 29 doba po alloHSCT . Remisja molekularna. Brak transkryptu.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 2)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 2)



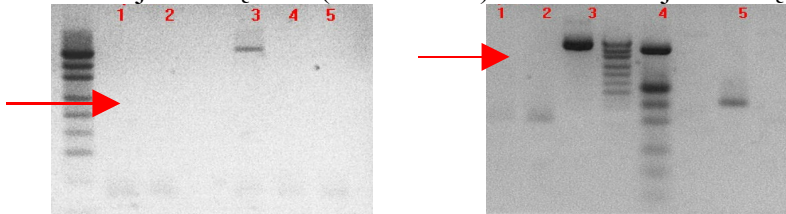
**C. 60 doba po alloHSCT. Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 12)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 26)



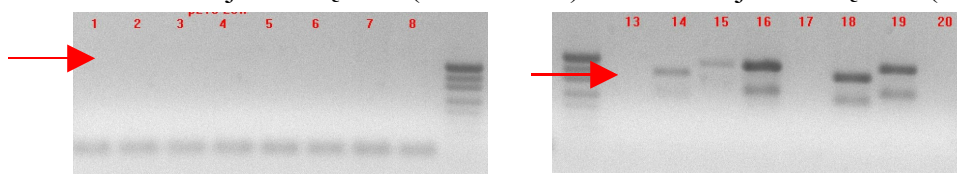
**D. 88 doba po alloHSCT . Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 1)



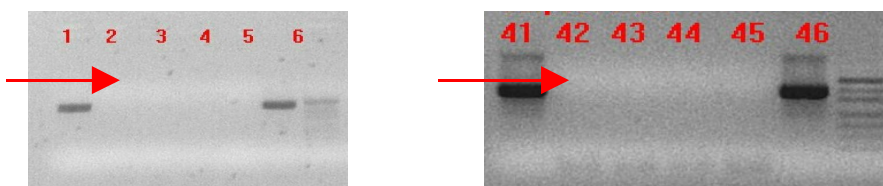
**E. 6 miesięcy po alloHSCT. Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 13)



**F. 13 miesięcy po alloHSCT. Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 2)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 42)

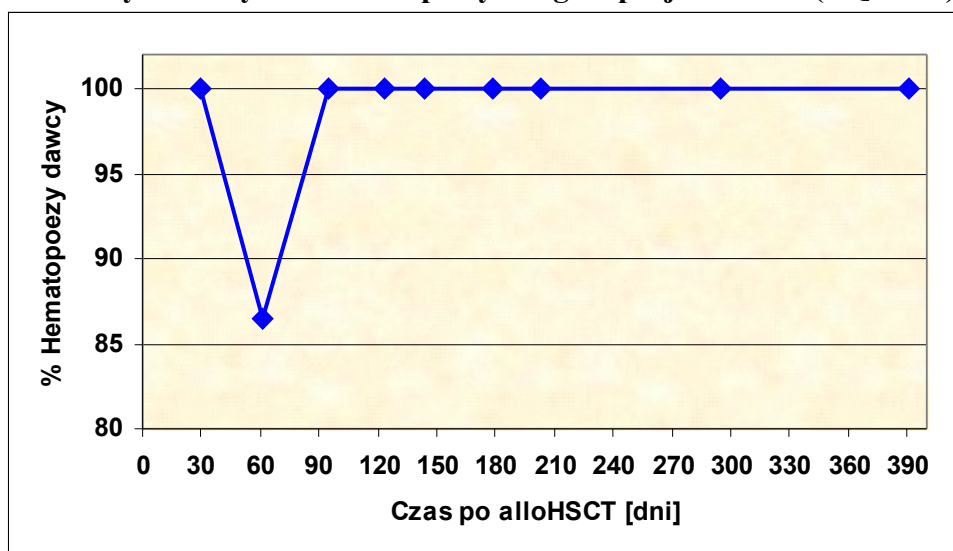




W dalszej części podrozdziału zostaną przedstawione wyniki monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego uzyskane przy pomocy metody RQ-PCR w sposób graficzny ujęte na Rycinie 27 i szczegółowo zestawione w Tabeli 17a (Aneks Tabele). W 60 dobie po allogenicznej transplantacji, podobnie jak w przypadku wyniku uzyskanego przy pomocy metody STR-PCR, zaobserwowano pojawienie się przejściowego mieszanego chimeryzmu na poziomie 86,5% udziału hematopoezy dawcy. Pomiary we wszystkich pozostałych punktach czasowych wskazywały na obecność całkowitego chimeryzmu hematopoetycznego dawcy na poziomie 100%. Taki przebieg zmian chimeryzmu był zgodny zarówno z wynikami uzyskanymi przy pomocy metody STR-PCR jak i RT-PCR.

Zgodność zmian chimeryzmu hematopoetycznego z wynikami badań śledzących chorobę resztkową stwierdzono u 20 pacjentów (53%).

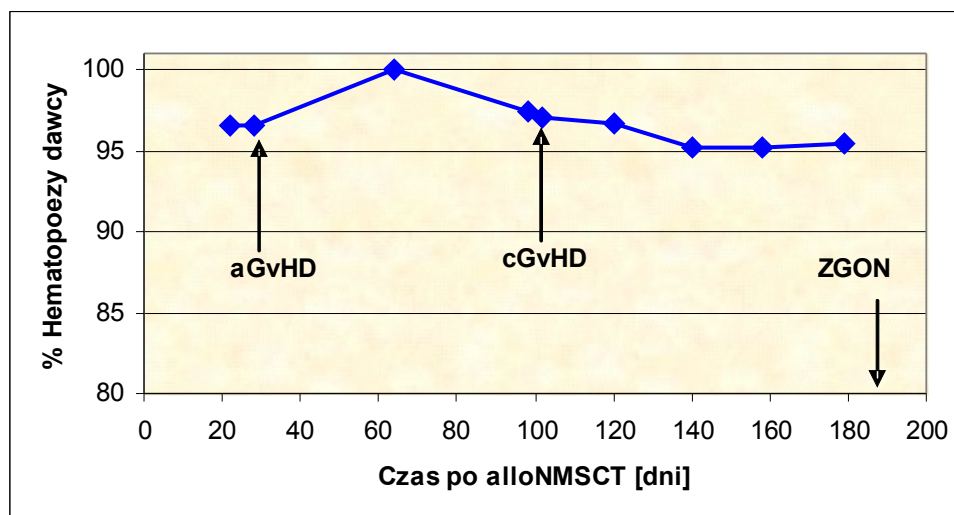
**Rycina 27. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentki AW (RQ-PCR)**



Poniżej przedstawiono drugi przykład monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego u pacjenta w remisji molekularnej, który dowodzi dużej zgodności wyników analiz molekularnych z pojawieniem się klinicznego zjawiska - GvHD, występującego zwykle u pacjentów, u których doszło do wszczepienia i rozwoju hematopoezy dawcy. Pacjenta ZJ (nr 24), u którego stwierdzono T – komórkową ostrą białaczkę limfoblastyczną (T-ALL) poddano drugiej allogenicznej transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem niemieloablacyjnym. W badaniu RT-PCR w chwili diagnozy wykryto obecność transkryptu  $e_{1a_2}$ , który odpowiada obecności recyprokalnej translokacji zachodzącej między chromosomem 9 i 22 t(9;22). Wszczepienie molekularne u tego chorego stwierdzono w 22 dobie po alloNMSCT (Rycina 28 Tabela 17b, Aneks Tabele). Objawy aGvHD III stopnia pojawiły się już w 25 dobie po

alloNMSCT. Badanie na obecność transkryptu  $e_{1\alpha 2}$  wykonane w 27 dobie po allogenicznej transplantacji wykazało, iż pacjent znajduje się remisji molekularnej (Ryc. 29A). Badanie przeprowadzone przy pomocy metody STR-PCR wskazywało na utrzymujący się całkowity chimeryzm dawcy. Badanie RT-PCR wykonane w 90 dobie po alloNMSCT ponownie wykazało remisję molekularną (Ryc. 29B). Także w badaniu chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy metody STR-PCR stwierdzono ponownie całkowity chimeryzm dawcy. Kolejne badania RT-PCR, z których ostatnie wykonano w 158 dobie po alloNMSCT, wskazywały na remisję molekularną (Ryc. 29C). We wszystkich badaniach metodą STR-PCR z których ostatnie wykonano w 180 dobie po alloNMSCT, stwierdzano CC. Powyższe wyniki potwierdzał stan kliniczny pacjenta, u którego w czasie całego okresu potransplantacyjnego rozwijała się choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD). Do 100 doby po alloNMSCT GvHD, która klasyfikowana jest jako postać ostra a, w późniejszym okresie jako forma przewlekła (cGvHD) zaatakowała wszystkie organy docelowe. U pacjenta stwierdzono zajęcie układu pokarmowego, zwyrodnienie stawów, zwłóknienie skóry, zanik mięśni, osłabienie oraz depresję. Wszystkie te objawy cGvHD doprowadziły do zgonu pacjenta wyleczonego z choroby podstawowej w 190 dobie po alloNMSCT

**Rycina 28. Osiągnięcie CC a występowanie GvHD Pacjent ZJ (STR-PCR)**

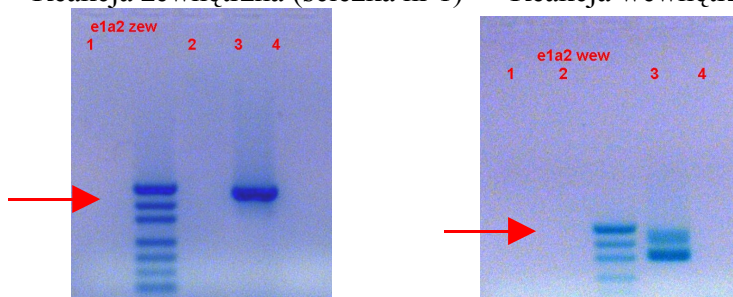


---

**Rycina 29 Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp e<sub>1a2</sub> przy pomocy metody RT-PCR (pacjent ZJ)**

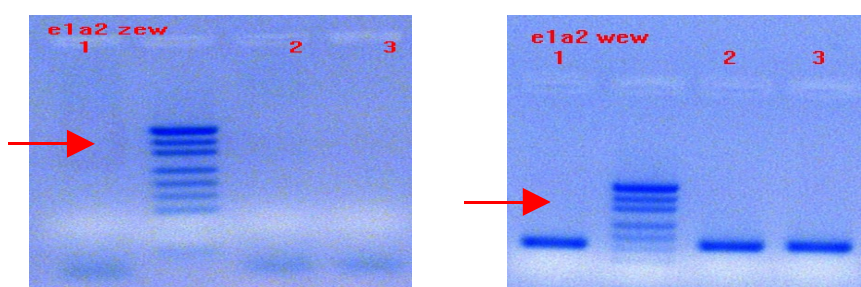
**A. 27 doba po alloNMSCT . Remisja molekularna. Brak transkryptu.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr1)



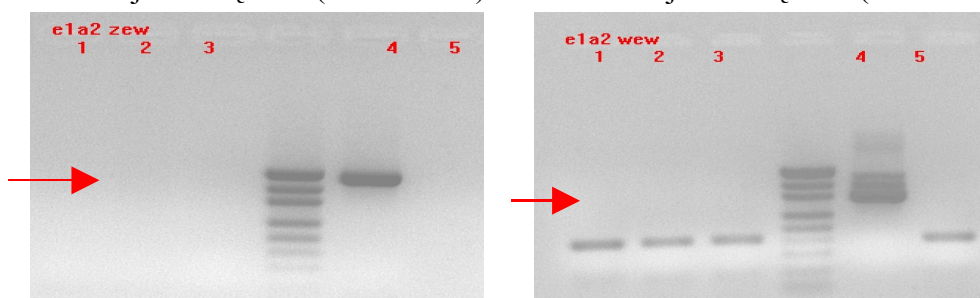
**B. 90 doba po alloNMSCT . Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 1)



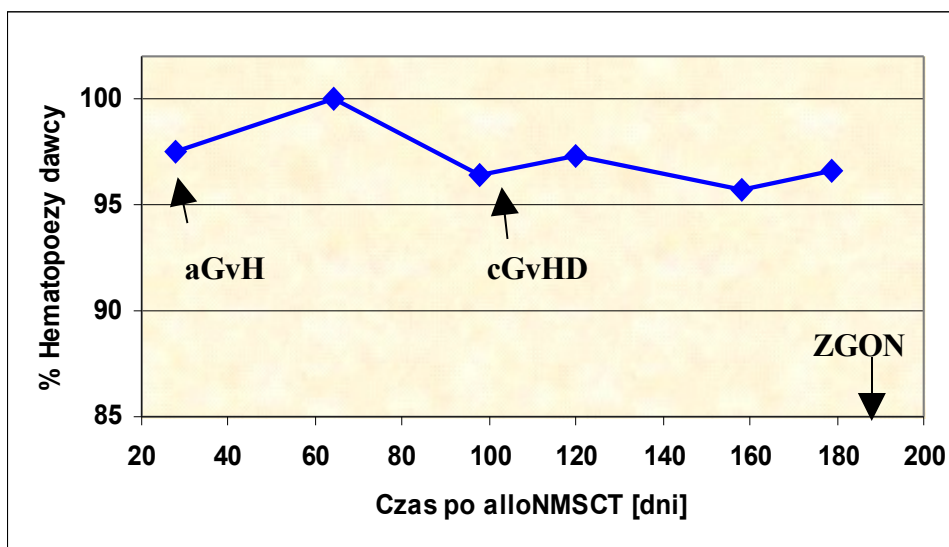
**C. 158 doba po alloNMSCT . Remisja molekularna. Brak transkryptu**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)      Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 1)



Badanie chimeryzmu hematopoezy przy pomocy metody ilościowej wykazało, że uzyskane wyniki są w pełni zgodne z tymi otrzymanymi przy pomocy metod STR-PCR oraz RT-PCR. Graficznie kinetykę chimeryzmu ocenioną przy pomocy metody RQ-PCR przedstawiono na Rycinie 30 oraz w Tabeli 18b (Aneks Tabele). W badanej populacji pacjentów z powodu GvHD zmarło 6 osób (16%).

Rycina 30. Osiągnięcie CC a występowanie GvHD Pacjent ZJ (RQ-PCR)



#### 4.14.4 Wpływ leczenia antyproliferacyjnego i immunosupresyjnego na zmiany chimeryzmu hematopoetycznego

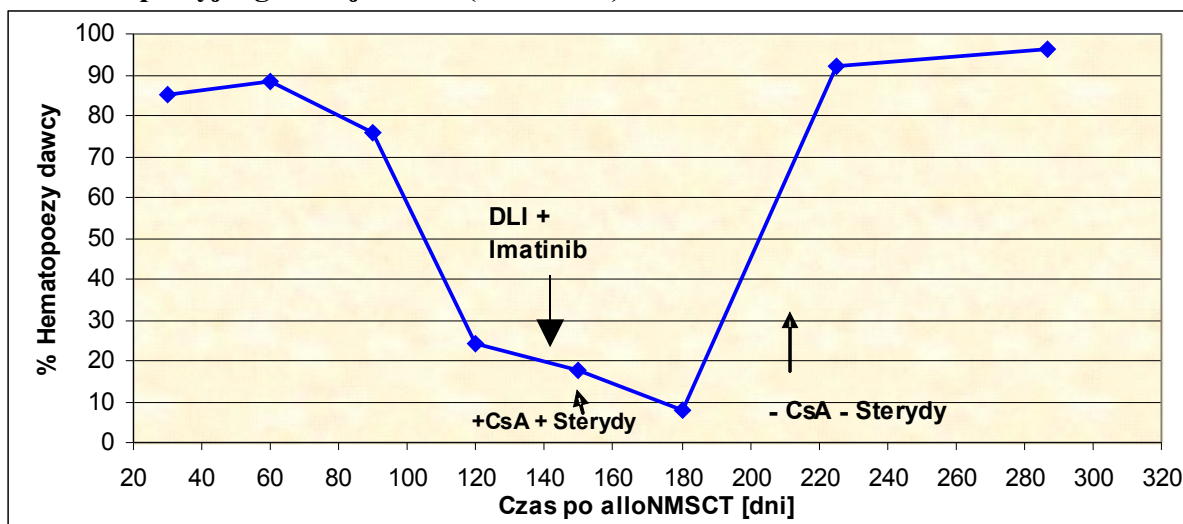
Przedstawiony poniżej przykład dotyczy 36-letniego pacjenta JSz (nr 34) poddanego allogenicznej transplantacji w 3 fazie chronicznej CML. Przy pomocy metody RT-PCR stwierdzono występowanie transkryptu bcr/abl w odmianie b<sub>2</sub>a<sub>2</sub>. Przeprowadzoną transplantację poprzedzono niemieloablacyjnym kondycjonowaniem. Przed 100 dobą po alloNMSCT nie stwierdzono wszczepienia molekularnego. Maksymalny udział hematopoezy dawcy w 60 dobie po alloNMSCT wynosił 89,4% we krwi obwodowej i 88,6% w szpiku kostnym (Ryc. 31 Tabela 17b, Aneks Tabele). W kolejnym badaniu szpiku kostnego przy pomocy metody STR-PCR wykonanym w 90 dobie po allogenicznej transplantacji stwierdzono spadek udziału hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu do 75,8%. Badanie chimeryzmu hematopoetycznego przeprowadzone w 120 dobie po alloNMSCT wykazało dalsze obniżenie udziału hemopoezy dawcy w krwiotworzeniu do poziomu 28% (szpik kostny). W badaniu RT-PCR wykonanym w 140 dobie po alloNMSCT stwierdzono nawrót molekularny (Ryc.32A). Na tej podstawie podjęto decyzję terapeutyczną o podaniu pacjentowi infuzji limfocytów dawcy (DLI) oraz specyficznego inhibitora kinazy tyrozynowej bcr/abl - Imatinibu. Po zastosowanym leczeniu pojawiły się objawy choroby GvHD. Zastosowano leczenie immunosupresyjne (sterydy kory nadnerczy i cyklosporynę A) czego następstwem była poprawa kliniczna, jednak równocześnie obserwowano dalsze obniżanie udziału hematopoezy dawcy w całkowitym krwiotworzeniu, która w 180 dobie po alloNMSCT osiągnęła poziom 7,9%. W badaniu RT-PCR nadal

wykrywano transkrypt bcr/abl (195 doba) (Ryc.32B). Po 2 miesiącach od podana DLI (210 doba po alloNMSCT) odstawiono leczenie immunosupresyjne. Badanie chimeryzmu wykonane dwa tygodnie później (225 doba po alloNMSCT) wykazało 92,1% udział hematopoезы dawcy (szpik kostny). O zmniejszeniu puli komórek nowotworowych biorcy świadczył także wynik badania szpiku metodą RT-PCR, w którym wynik pozytywny na obecność transkryptu bcr/abl uzyskano dopiero w wewnętrznej reakcji PCR (Ryc.32C). W kolejnym badaniu chimeryzmu hematopoetycznego (287 doba po alloNMSCT) stwierdzono wszczepienie molekularne (udział hematopoезы dawcy w szpiku wynosił 96,3%). Badanie RT-PCR wykazało remisję molekularną (Ryc. 32D).

Przebieg zmian chimeryzmu hematopoetycznego monitorowano również przy pomocy metody ilościowej. Graficznie przedstawiono go na Rycinie 33, a szczegółowe wyniki zestawiono w Tabeli 18b (Aneks Tabele). Przebieg zmian chimeryzmu hematopoetycznego uzyskany przy pomocy metody RQ-PCR wykazał zgodność z wynikami uzyskanymi przy pomocy metody półilościowej i metody RT-PCR.

Zastosowane metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego okazały się przydatne do monitorowania skuteczności zastosowanego leczenia immunosupresyjnego i antyproliferacyjnego.

**Rycina 31. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego pod wpływem leczenia immunosupresyjnego. Pacjent JSz (STR-PCR)**

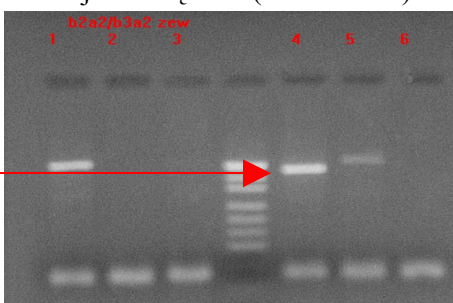


**Rycina 32. Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp b<sub>2</sub>a<sub>2</sub> metodą RT-PCR (pacjent JSz)**



**A. 140 doba po alloNMSCT. Nawrót molekularny. Transkrypt obecny w reakcji zewnętrznej.**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 4)

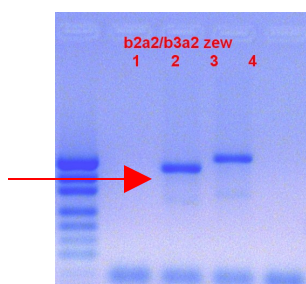


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 4)



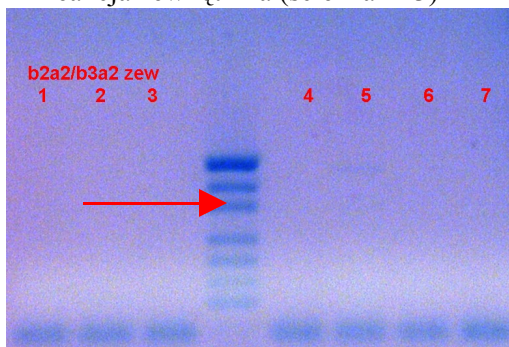
**B. 195 doba po alloNMSCT. 50 dni po podaniu DLI i Imatinibu, 40 dni po podaniu CsA i sterydów. Nawrót molekularny**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 2)

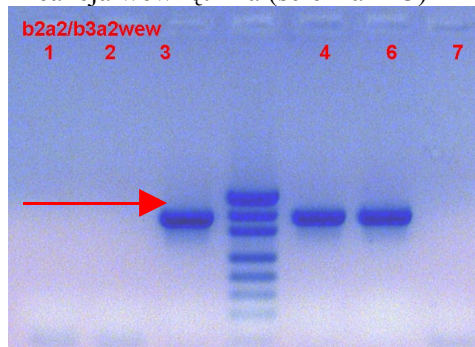


**C. 225 doba po alloNMSCT (2 miesiące po DLI) odstawienie CsA i sterydów. Redukcja ilości transkryptu – transkrypt widoczny w reakcji wewnętrznej**

Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 3)

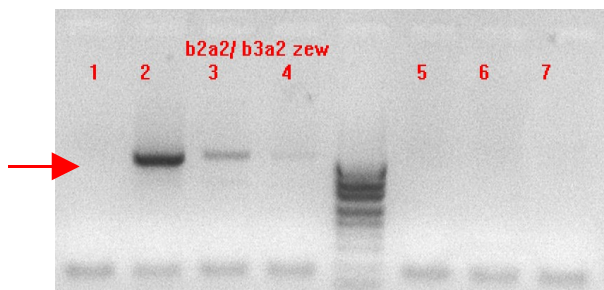


Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 3)

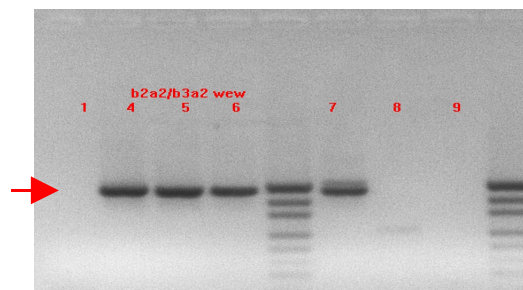


**D. 287 doba po alloNMSCT. 80 dni po odstawieniu CsA i sterydów. Remisja molekularna**

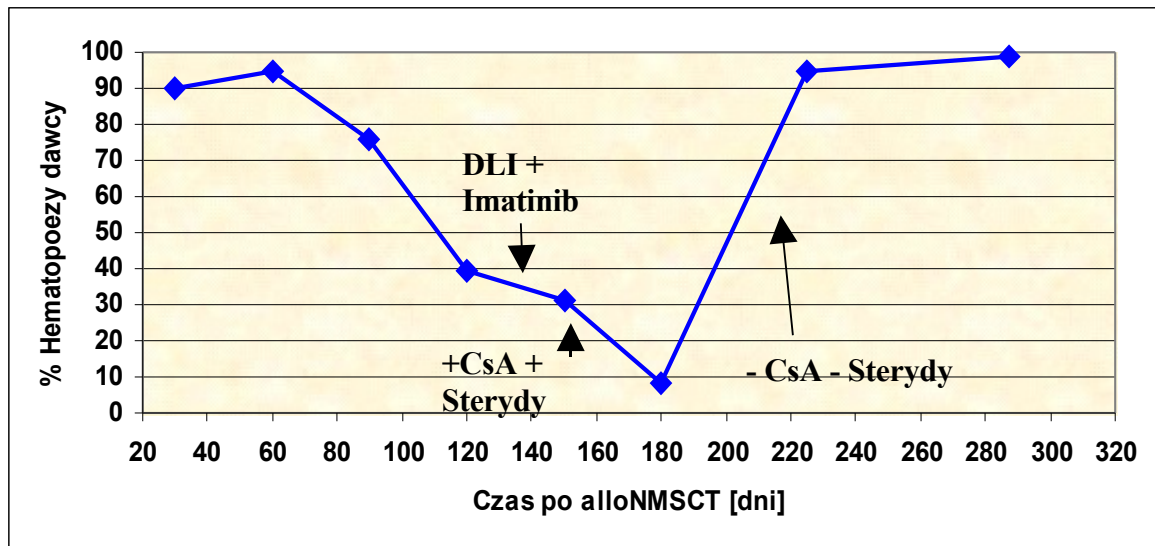
Reakcja zewnętrzna (ścieżka nr 1)



Reakcja wewnętrzna (ścieżka nr 1)



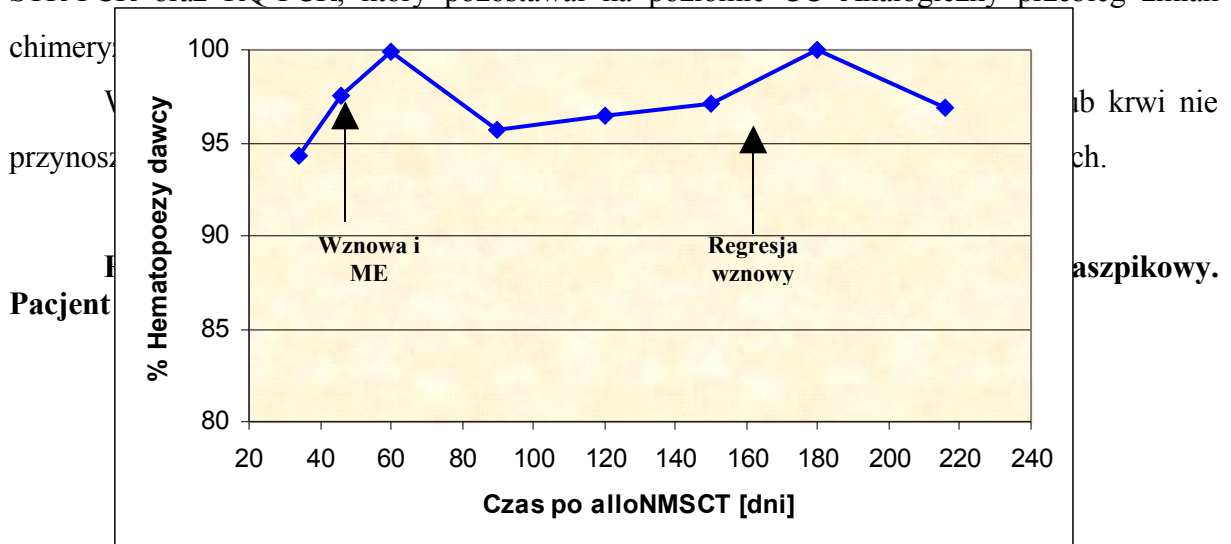
**Rycina 33. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego pod wpływem leczenia immunosupresyjnego. Pacjent JSz (RQ-PCR)**



#### 4.14.5 Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego ocenianego w szpiku i krwi obwodowej nie odzwierciedlają nawrotu pozaszpikowego

Materiałem diagnostycznym, w którym śledzi się chorobę resztkową oraz przeprowadza się ocenę zmian chimeryzmu hematopoetycznego jest szpik kostny lub krew obwodowa. W praktyce klinicznej obserwuje się jednak przypadki kiedy wznowa choroby podstawowej ma miejsce w przestrzeniach pozaszpikowych. Do takiej wznowy doszło u chorego ZW (nr 39) poddanego alloPBSCT z powodu szpiczaka mnogiego (MM). Wszczępienie molekularne (ME) ocenione przy pomocy metody RQ-PCR nastąpiło w 33 dobie po transplantacji (Ryc. 35). W badaniu wykonanym w 101 dobie przy pomocy metody rezonansu magnetycznego (MRI) wykazano wznowę choroby w przestrzeniach pozaszpikowych. W tym czasie badanie chimeryzmu hematopoetycznego wykazało całkowity chimeryzm dawcy (Ryciny 34 i 35).

Dalsza progresja zmian w badaniach obrazowych, a następnie regresja wznowy nie wpłynęła na wyniki chimeryzmu hematopoetycznego ocenianego przy pomocy metod STR-PCR oraz RQ-PCR, który pozostawał na poziomie CC. Analogiczny przebieg zmian

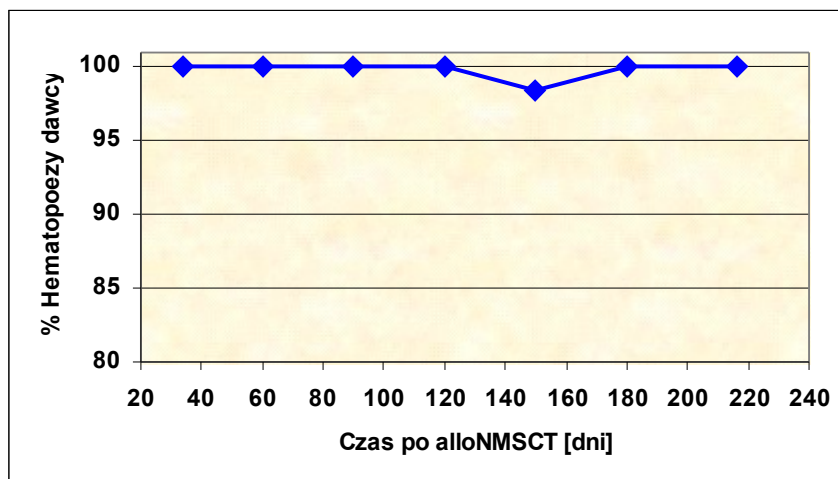


ch. w krwi nie  
ch.  
szpikowych.

---

ME – wszczepienie molekularne

**Rycina 35. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego a nawrót pozaszpikowy. Pacjent ZW (RQ-PCR)**



ME- wszczepienie molekularne

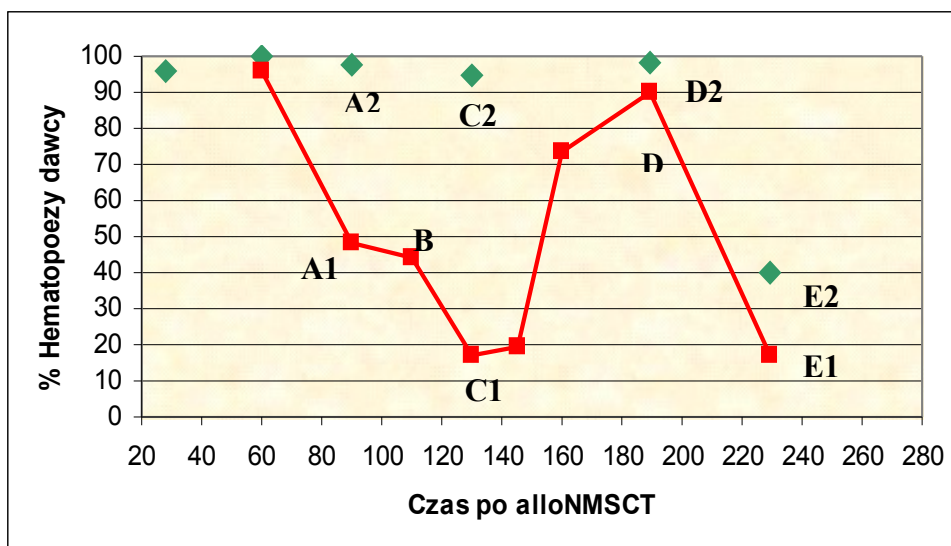
#### 4.14.6 Wpływ infuzji limfocytów dawcy (DLI) na chimeryzm we krwi i szpiku



---

W niniejszym podrozdziale zaprezentowano przykład zastosowania DLI i jej wpływ na kinetykę chimeryzmu hematopoetycznego w szpiku i krwi. U 20-letniej pacjentki AH (nr 32) z powodu ostrej białaczki szpikowej AML-M4 przeprowadzono alloNMSCT. Wszczepienie molekularne stwierdzono w 10 dobie. Do 60 doby po alloNMSCT chimeryzm hematopoetyczny był na poziomie pełnego chimeryzmu dawcy (w szpiku 99,8% a we krwi 100%). W kolejnym badaniu wykonanym w 90 dobie stwierdzono, że poziom chimeryzmu hematopoetycznego we krwi obwodowej pozwalał na stwierdzenie pełnego chimeryzmu dawcy (97,6% Ryc.36 pkt A2). W szpiku kostnym obserwowano wówczas mieszany chimeryzm na poziomie 48,4% udziału hemopoezy dawcy w całkowitym krwiotworzeniu, co było równoznaczne z nawrotem choroby (Ryc. 36 pkt A1). W 110 dobie po alloNMSCT podano DLI (Ryc. 36 pkt B). Po 3 tygodniach od wykonania DLI (133 doba po alloNMSCT) we krwi stwierdzono CC na poziomie 95% hematopoezy dawcy (Ryc. 36 pkt C2) natomiast w szpiku kostnym obserwowano MC, który uległ pogłębieniu do poziomu 17,2% hemopoezy dawcy (Ryc. 36 pkt C1). Badanie wykonane 3 miesiące po przeprowadzeniu DLI (189 doba po alloNMSCT) przyniosło informacje o wzroście udziału hematopoezy dawcy w szpiku kostnym do poziomu 89,8 % (Ryc. 36 pkt D1) natomiast we krwi obwodowej do poziomu 98,3% dawcy (Ryc. 36 pkt D2). 4 miesiące po wykonaniu DLI (232 doba po alloNMSCT) badanie chimeryzmu hematopoetycznego przy pomocy metody STR-PCR wykazało, że tendencja wzrostowa uległa odwróceniu i zarówno w szpiku kostnym jak i krwi obwodowej stwierdzono mieszany chimeryzm na poziomie odpowiednio 17,1% (Ryc. 36 pkt E1) i 39,8% (Ryc. 36 pkt E2) udziału hematopoezy dawcy. U pacjentki doszło do wznowy w konsekwencji czego w 348 dobie po alloNMSCT nastąpił zgon.

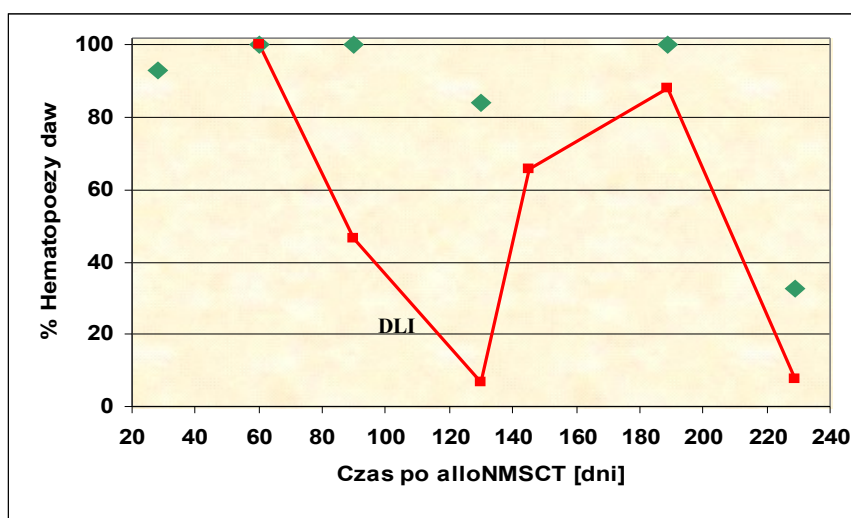
**Rycina 36. Kinetyka chimeryzmu hematopoezy u pacjentki AH poddanej DLI. (STR-PCR)**



Linia czerwona – krew; Punkty zielone – szpik

Na Rycinie 37 i w Tabeli 18b (Aneks Tabele) przedstawiono przebieg kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego zbadanego u pacjentki AH (nr 32) przy pomocy metody ilościowej. Ponieważ przy pomocy metody RQ-PCR nie przeprowadzono monitorowania wczesnej kinetyki chimeryzmu hematopoetycznego nie można stwierdzić, czy przed 28 dobą po drugiej allogenicznej transplantacji wystąpiło wszczepienie molekularne. Z uzyskanych danych wynika, że całkowity chimeryzm dawcy na poziomie 100%, zarówno we krwi obwodowej jak i szpiku kostnym, pojawił się w 60 dobie po alloNMSCT. Kolejne planowe badanie chimeryzmu hematopoetycznego wykonywane przy pomocy metody ilościowej wykazały pełną zgodność z obrazem kinetyki uzyskanym przy pomocy metody STR-PCR

**Rycina 37. Kinetyka chimeryzmu hematopoezy u pacjentki AH poddanej DLI. (RQ-PCR)**



Linia czerwona – krew obwodowa; punkty zielone – szpik kostny

Wydaje się, że przejściowy dobry wynik chimeryzmu uzyskany w 189 dobie we krwi wynikał z obecności w niej limfocytów T dawcy podanych w czasie DLI. Wynik uzyskany

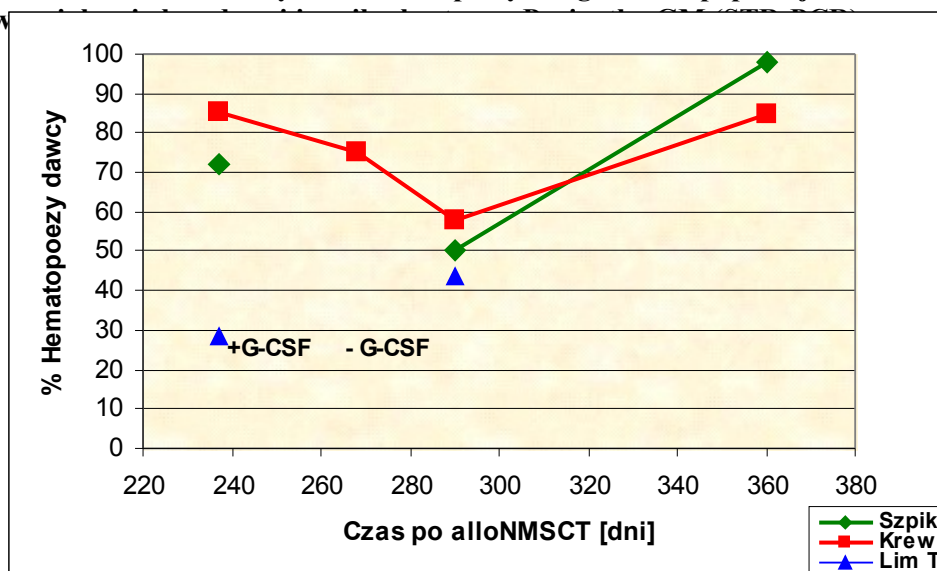
w szpiku kostnym był najprawdopodobniej zafalszowany w momencie pobierania materiału do badania poprzez zanieczyszczenie krwią obwodową. W pozostałych punktach czasowych wyniki uzyskane ze szpiku cechowała większa zgodność z sytuacją kliniczną pacjentki.

#### 4.14.7 Monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji limfocytów T

W celu zwiększenia czułości oznaczenia wykonywanego przy pomocy metody STR-PCR jak i uzyskania informacji o przewidywanym rozmiarze aplazji szpiku kostnego po podaniu DLI ocenę poziomu chimeryzmu hematopoetycznego wykonywano w subpopulacji limfocytów T.

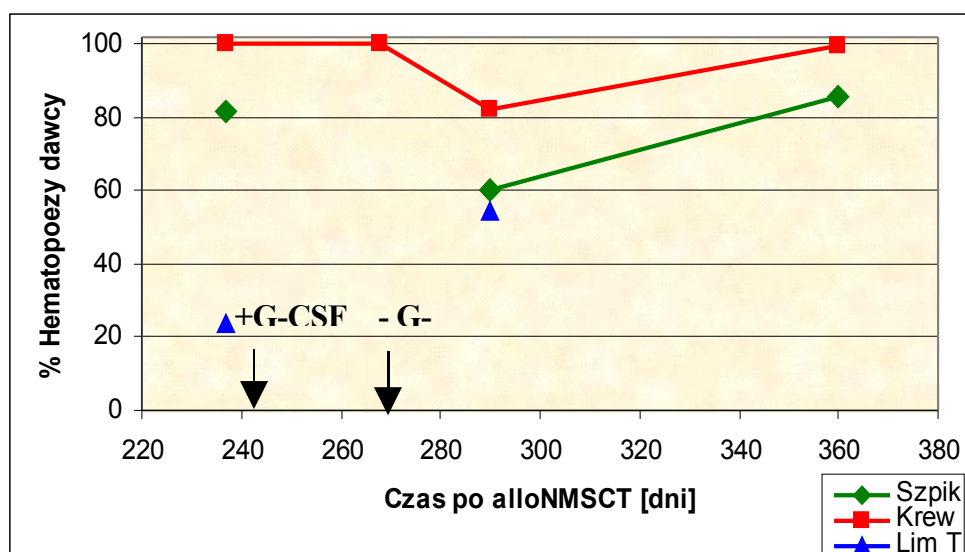
Pacjentka GM (nr 33) została poddana allogenicznej transplantacji z powodu ostrej białaczki szpikowej (AML-M4). W 237 dobie po alloNMSCT wykonano kontrolne badanie chimeryzmu hematopoetycznego, które przyniosło informacje o zmniejszającym się udziale hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu zarówno w szpiku kostnym (72,3%) jak i pełnej krwi obwodowej (85,5%) (Ryc. 38, Tabela 17b, Aneks Tabele). Udział hematopoezy dawcy oceniony w subpopulacji limfocytów T wynosił 28,5%. W 240 dobie po transplantacji podano czynnik wzrostu G-CSF. W kolejnym badaniu wykonanym w 268 dobie we krwi obwodowej udział hematopoezy dawcy wyniósł 75%. Po 33 dniach (w 270 dobie po alloNMSCT) przerwano podawanie G-CSF. Kontrolne badanie chimeryzmu wykonane 20 dni później (320 doba po alloNMSCT) wykazało udział hematopoezy dawcy w szpiku kostnym – 50,1%, we krwi obwodowej – 57,8%, natomiast w subpopulacji limfocytów T – 43,5 %. W subpopulacji limfocytów T zaobserwowano niemalże 20% wzrost udziału chimeryzmu dawcy. Badanie wykonane w 360 dobie po alloNMSCT wykazało, że po podaniu czynnika wzrostu doszło do pełnego wszczepienia molekularnego - udział hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu wyniósł 98% w szpiku kostnym, a w pełnej krwi obwodowej 85%.

Rycina 38. Różnice zmian chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji komórek CD3+, niefrakcjonow



Na Rycinie 39 przedstawiono przebieg monitorowania chimeryzmu u pacjentki GM (nr 33) przy pomocy metody RQ-PCR w wybranych punktach czasowych. Pełną charakterystykę chimeryzmu hematopoetycznego przedstawiono w Tabeli 18b (Aneks Tabele). Wynik badania w 237 dobie po alloNMSCT we krwi obwodowej wskazywał na CC (100%), jednakże w szpiku kostnym stwierdzono mieszany chimeryzm na poziomie 81,8%. Wynik uzyskany w subpopulacji limfocytów T sugerował zbliżającą się utratę przeszczepu, gdyż udział limfocytów T dawcy w całkowitej subpopulacji wynosił zaledwie 23,9%. 20 dni po zaprzestaniu podawania czynnika wzrostu we krwi obwodowej i w szpiku kostnym stwierdzono zmniejszenie udziału w krwiotworzeniu dawcy, gdyż poziom chimeryzmu wynosił odpowiednio 82,1% oraz 60,2%. Odmienną tendencję zaobserwowano w populacji limfocytów T wyizolowanych z krwi obwodowej – udział komórek dawcy w tej subpopulacji uległ zwiększeniu do 54,7%. Badanie wykonane po 3 miesiącach po odstawieniu czynnika wzrostu (360 doba) przyniosło informację o powrocie całkowitego chimeryzmu dawcy we krwi obwodowej do poziomu 99,9%. W szpiku kostnym nie stwierdzono wszczępienia molekularnego jednakże zaobserwowano tendencję wzrostową udziału hemopoezy dawcy w krwiotworzeniu do 85,6%. Podsumowując, przy pomocy metody RQ-PCR uzyskano podobny obraz chimeryzmu hematopoetycznego jaki uzyskano przy pomocy metody STR-PCR.

**Rycina 39. Różnice w zmianach chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji komórek CD3+, niefrakcjonowanej krwi obwodowej i szpiku kostnym. Pacjentka GM (RQ-PCR)**



Podanie czynnika wzrostu spowodowało odbudowę hematopoezy dawcy.

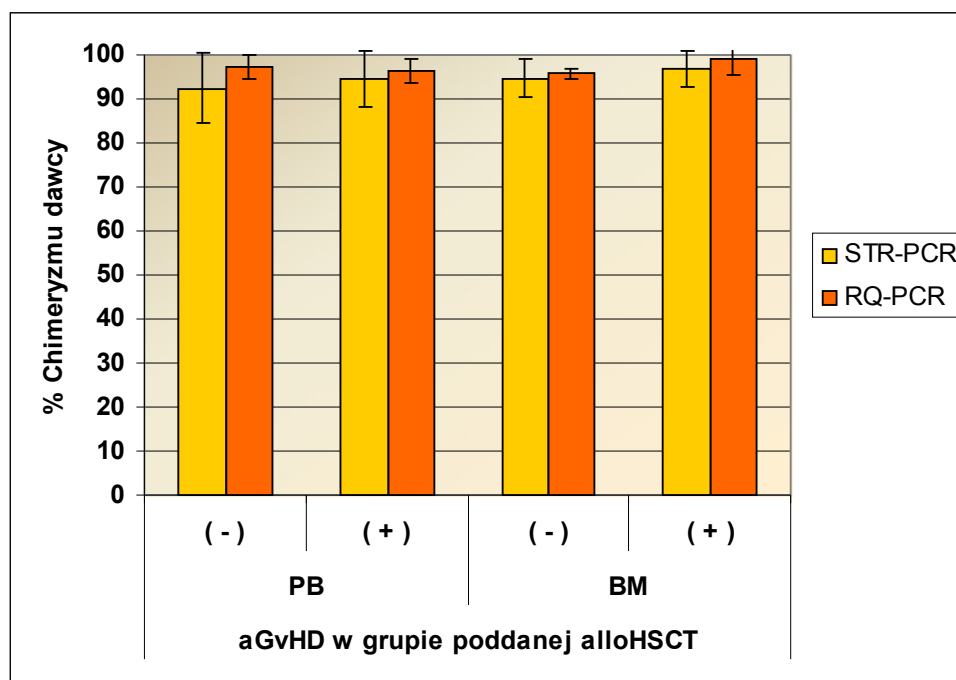
#### 4.15 Zmiany chimeryzmu hemopoetycznego a ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD)

Analizie chimeryzmu hemopoetycznego poddano grupę pacjentów, u których wystąpiła ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (aGvHD) (Tabela 20 Aneks Tabele)

Choroba aGvHD wystąpiła u 15/21 pacjentów z grupy poddanej alloHSCT i u 12/22 pacjentów zakwalifikowanych do transplantacji niemieloablacyjnej.

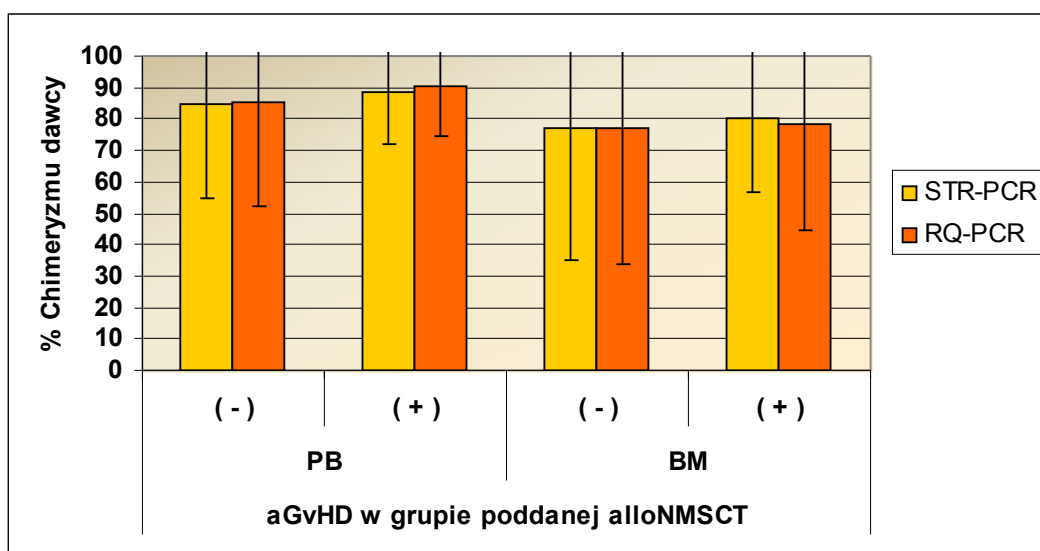
Oddzielnie w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT i alloHSCT przeprowadzono porównanie poziomu chimeryzmu hemopoezy, uzyskanego przy pomocy metody STR-PCR i RQ-PCR, z wystąpieniem lub nie aGvHD. Uzyskane wyniki zebrano na Rycinach 40 i 41.

Rycina 40. Chimeryzm hematopoezy a aGvHD w grupie pacjentów po alloHSCT



PB- krew obwodowa, BM- szpik kostny

Rycina 41. Chimeryzm hematopoezy a aGvHD u pacjentów po alloNMSCT



PB- krew obwodowa, BM- szpik kostny

Wśród pacjentów poddanych alloHSCT przy użyciu metody STR-PCR zarówno we krwi obwodowej jak i szpiku kostnym stwierdzono wyższy udział chimeryzmu dawcy w krwiotworzeniu w grupie, w której wykryto aGvHD niż w grupie wolnej od tej choroby, nie był on jednak istotny statystycznie ( $p = 0,51$  krew obwodowa  $p = 0,33$  szpik kostny). Odmiennie przedstawiała się sytuacja, gdy oceny chimeryzmu w grupie pacjentów po alloHSCT dokonywano przy pomocy metody ilościowej. Wówczas uzyskane rezultaty wskazują na wyższy poziom chimeryzmu hemopoetycy dawcy we krwi obwodowej i szpiku kostnym w grupie pacjentów z aGvHD. W przypadku tego ostatniego materiału uzyskany wynik cechowała istotność statystyczna ( $p = 0,012$ ).

W grupie pacjentów poddanych alloNMSCT wykazano analogiczną zależność jak w grupie poprzedniej jednakże w żadnym analizowanym przypadku nie uzyskano istotności statystycznej (STR-PCR w szpiku  $p = 0,73$ ; we krwi  $p = 0,78$ ; RQ-PCR w szpiku  $p = 0,96$ ; we krwi  $p = 0,67$ ).

Powyższe wyniki dowodzą, że wysoki poziom chimeryzmu dawcy może wskazywać na duże prawdopodobieństwo wystąpienia aGvHD.

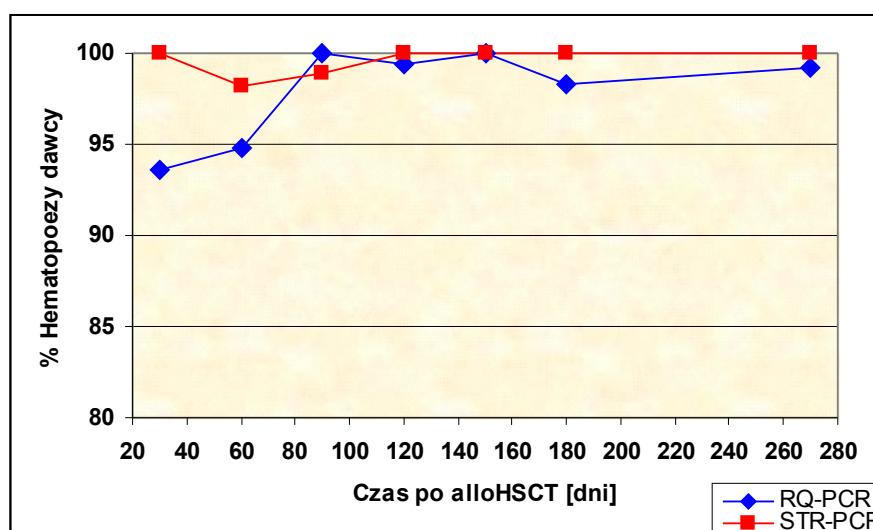
#### 4.16 Mieszany chimeryzm hematopoetyczny jako docelowy efekt allogeniczej transplantacji

Grupa pacjentów z anemią aplastyczną włączona w ocenę chimeryzmu hematopoetycznego liczyła 5 osób. Dwoje z nich (pacjenci MB nr 19 i MM nr 20) poddano

---

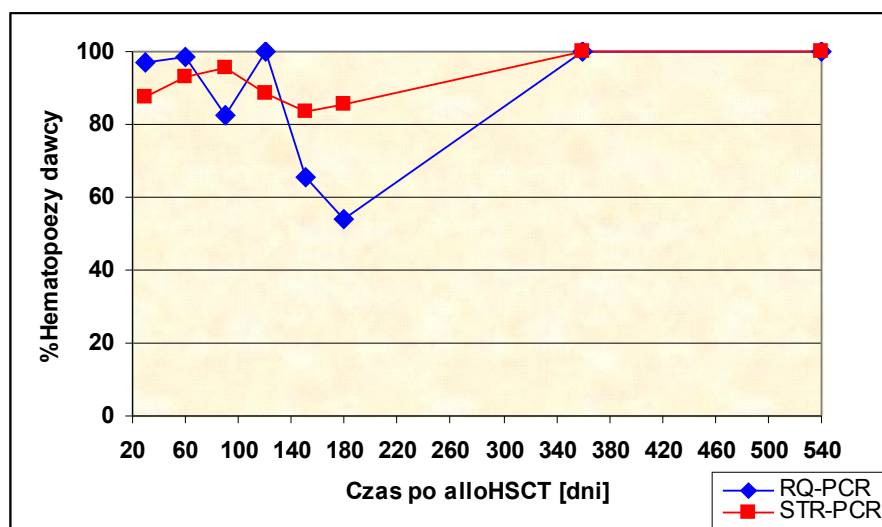
alloHSCT, u pozostałych (KG nr 41, PG nr 42 oraz UK nr 43) przeprowadzono allogeniczną transplantację poprzedzoną alloNMSCT. U dwóch pacjentów jednego poddanego alloNMSCT i jednego poddanego alloHSCT przy pomocy metody STR-PCR stwierdzono całkowity chimeryzm dawcy (Ryc.42).

**Rycina 42. Całkowity chimeryzm hematopoetyczny u pacjenta MM z vSAA (STR-PCR i RQ-PCR)**



W pozostałych przypadkach stwierdzono przy pomocy metody ilościowej i ilościowej przejściowy lub uporczywie utrzymujący się mieszany chimeryzm hematopoetyczny (Ryc. 43), który u pacjentów MB (nr 19) oraz PG (nr 42) nie wymagał interwencji terapeutycznych. Odmiennie przedstawiała się sytuacja u pacjentki KG (nr 41), u której podanie czynnika wzrostu okazało się niezbędnym działaniem farmakologicznym.

**Rycina 43. Mieszany chimeryzm hematopoetyczny u pacjentki MB z vSAA (STR-PCR i RQ-PCR)**



U pacjentów poddanych alloSCT z powodu anemii aplastycznej osiągnięcie stanu mieszanego chimeryzmu jest również wystarczające do odtworzenia prawidłowo funkcjonującej hematopoezy, jak w przypadku osiągnięcia całkowitego chimeryzmu dawcy.

## Rozdział 5

### DYSKUSJA

#### 5.1 Wprowadzenie

Allogeniczna transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych jest obecnie terapią z wyboru dla wielu pacjentów, u których rozpoznano nowotworowe



---

i nienowotworowe schorzenia hematologiczne. Przeszczepienie allogeniczne jest złożonym procesem obejmującym wszczepienie pluripotencjalnych komórek macierzystych pochodzących od dawcy, które następnie odbudowują prawidłowo funkcjonujący układ krwiotwórczy i immunologiczny. Po przeprowadzeniu transplantacji bardzo istotnym jest określenie czy komórki szpiku kostnego i krwi obwodowej pochodzą z resztkowych komórek macierzystych biorcy przetrwałych po kondycjonowaniu, czy też z komórek hematopoetycznych dawcy. Chimeryzm powstający po transplantacji jest procesem dynamicznym i jedynie badania wykonywane często i regularnie mogą przynieść informację o koegzystencji komórek dawcy i biorcy. Kluczowym dla zrozumienia zagadnienia chimeryzmu jest określenie czy u danego pacjenta stwierdzono stopniowo obniżający się udział komórek autologicznych, stopniowo zwiększający się udział komórek biorcy w krwiotworzeniu czy też całkowity chimeryzm dawcy, a u których doszło do ponownego pojawienia się resztkowej hematopoezy biorcy [31, 48, 49]. Ponadto istotne jest rozstrzygnięcie czy mieszany chimeryzm (MC) jest powodowany przez dojrzałe komórki biorcy bez zdolności do samoodnowy czy też wynika on z obecności komórek progenitorowych biorcy, które dadzą początek uporczywemu mieszanemu chimeryzmowi [50]. Na zjawisko wystąpienia mieszanego chimeryzmu po transplantacji ma wpływ wiele czynników związanych z procedurami transplantacyjnymi i z cechami indywidualnymi pacjenta. Zaliczamy do nich: typ warunków kondycjonujących, rodzaj dawcy, poddanie materiału przeszczepowego deplecji limfocytów T czy też rodzaj zastosowanej profilaktyki choroby GvH, mniejsza ilość podanych w materiale przeszczepowym komórek CD34+, źródło komórek hematopoetycznych. Z kolei ze strony pacjenta decydujące dla mieszanego chimeryzmu znaczenie mają: wiek i rodzaj schorzenia podstawowego [36, 48, 51 – 56]. Gardiner i wsp. [49] oraz Perez-Simon i wsp. [57] wskazują dodatkowo na czynniki takie jak stan zaawansowania choroby w momencie wykonywania allogenicznej transplantacji, czułość metody, przy pomocy której oceniany jest poziom chimeryzmu oraz czas wykonywania badań.

W konsekwencji monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego stało się niezbędnym badaniem diagnostycznym we wszystkich ośrodkach wykonujących allogeniczne transplantacje komórek hematopoetycznych.

## **5.2 Metoda półilościowej oceny chimeryzmu hematopoetycznego (STR-PCR) - jej zalety i ograniczenia**

---

Do badania chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ wybrano dwie metody oparte na polimerazowej reakcji łańcuchowej. Pierwsza z nich to metoda STR-PCR o charakterze półilościowym [35, 49, 58]. W niniejszej rozprawie doktorskiej wybrano na podstawie literatury [29] 7 sekwencji STR. Zastosowano modyfikację startera sensownego w postaci przyłączenia barwnika fluorescencyjnego Cy 5,0 (Indodicarbocyanina) oraz czterokrotnie zredukowano jego stężenie w stosunku do startera antysensownego. Zmieniono także ilość DNA oraz profil temperaturowy reakcji PCR. Amplifikacji poddawano 50ng DNA w 25 µl mieszaniny reakcyjnej w czasie 30 cykli. Jako próg czułości metody STR-PCR uznano 5%.

Niewątpliwymi i niezaprzeczalnymi zaletami półilościowej metody STR-PCR są możliwość jej zastosowania niezależnie od układu płci w parze biorca – dawca allogenicznej transplantacji oraz w sytuacji leukopenii towarzyszącej okresowi okołotransplantacyjnemu, a także bezpośrednio po podaniu DLI lub chemioterapii. Technika STR-PCR jest powszechnie stosowana w praktyce klinicznej do oceny chimeryzmu hematopoetycznego [58 – 61]. W przeważającej części przypadków jest ona wykonywana w oparciu o komercyjnie dostępne zestawy primerów umożliwiające amplifikację 10 sekwencji STR. Zastosowana w badaniu ilość sekwencji STR nie jest jednak zbyt mała [55], gdyż nawet 3 – 5 sekwencji STR wystarcza do określenia różnic we wzorze allelicznym między biorcą a dawcą [47]. Wszystkie wybrane do niniejszej pracy sekwencje charakteryzuje obecność czteronukleotydowych powtórzeń tandemowych oraz brak sprzężenia z innymi zastosowanymi markerami – każda z sekwencji jest bowiem zlokalizowana na innym chromosomie. Cechują się one również dużą częstotliwością występowania, a każda z nich występuje w postaci co najmniej 7 alleli. Sekwencje te charakteryzuje także: wytrzymałość na różne sposoby izolacji DNA, wysoka czułość, niskie tło i wysoka reproduktywność [29].

Detekcja produktu PCR w czasie analizy długości fragmentów w sekwenatorze zapewnia większą czułość niż w przypadku oznaczeń densytometrycznych [29]. W związku z tym konieczne było wyznakowanie jednego startera barwnikiem fluorescencyjnym (wyznakowanie obu spowodowałoby pojawienie się na elektroforegramie dubletów) [59]. Redukcja ilości cykli reakcji PCR w stosunku do literatury [29] miała na celu uniknięcia występowania w czasie rozdzielania w żelu poliakrylamidowym pików tzw. pull-up [46, 62] świadczących o zbyt dużej ilości produktu po reakcji PCR.

Zastosowana ilość DNA została dobrana na drodze eksperymentalnej, odpowiada około 6000 – 7500 diploidalnych komórek i pozostaje w zgodności z ilością zaproponowaną w literaturze [29, 46, 49, 63]. W jej określeniu kierowano się następującymi przesłankami: ilość

---

DNA powinna zapewnić powtarzalne, a co z tego wynika wiarygodne wyniki, czyli musiała być większa niż proponowana w części literatury [31, 45, 55, 57, 64]. Z drugiej strony nie może powodować powstawania pików typu pull-up i musi być możliwa do uzyskania u pacjentów tuż po allogeniczej transplantacji kiedy to ilość komórek jądrzastych często nie przekracza 100-200/ $\mu$ l krwi obwodowej co byłoby raczej trudne przy ilości proponowanej przez inne źródła [39, 65].

Uzyskana czułość reakcji STR-PCR (5%) przy warunkach ustalonych jak opisane powyżej była porównywalna z danymi literaturowymi [45, 59, 60, 66, 67]. Niektóre źródła [25, 49, 68, 69] wykazują, że metoda ta powinna charakteryzować się większą czułością, bo pozwalającą na wykrycie resztkowej populacji komórek na poziomie rzędu 0,01%. Na czułość reakcji wpływa układ alleli w profilach genetycznych dawcy i biorcy. Najpowszechniej występującym w niniejszej pracy doktorskiej układem był taki, w którym jeden z alleli był wspólny, natomiast u dawcy i u biorcy stwierdzono obecność allelu informatywnego. Na czułość reakcji wpływa także różnica w ilości powtórzeń tworzących sekwencję rdzeniową w allelach informatywnych dla dawcy i dla biorcy w danej sekwencji STR. Allele o odmiennej wielkości różnią się bowiem stopniem amplifikacji w reakcji PCR – allele o mniejszej ilości par zasad amplifikują się efektywniej. Powodem tego jest zjawisko kompetycji fragmentów STR (od 2 do 4) o primery, deoksynukleotydy i polimerazę znajdujące się w mieszaninie reakcyjnej [70]. Idealnym rozwiązaniem wydaje się być wybór dla każdej pary biorca/dawca takich dwóch układów STR, z których w jednym allel charakterystyczny dla biorcy jest lżejszy, a w drugim cięższy niż allel charakterystyczny dla dawcy. W pierwszej sytuacji allel biorcy amplifikuje się efektywniej, a w drugiej unikamy błędnego uznania piku jaskającego się za piku specyficznego. W niniejszej pracy doktorskiej w większości par biorca /dawca wykryto profil genetyczny, w którym allel charakterystyczny dla biorcy miał krótszą sekwencję rdzeniową. Udało się jednak odnaleźć przypadki obecności w jednej sekwencji STR allelu lżejszego a w drugiej allelu cięższego charakterystycznych dla biorcy w danej parze biorca / dawca. Zaobserwowano wówczas mniejszą czułość oceny chimeryzmu hemopoezy opartej na sekwencji STR z allelem biorcy o dłuższej sekwencji rdzeniowej. W dwóch przypadkach ten układ wskazywał iż doszło do pełnego wszczepienia podczas gdy układ alternatywny wskazywał na mieszany chimeryzm.

Podsumowując należy stwierdzić, że uzyskany wynik można uwiarygodnić wykonując amplifikację więcej niż 1 sekwencji STR. W innym układzie allelicznym zwiększa się bowiem szansa na ujawnienie allelu reprezentującego mniejszościową populację [35, 45, 47].

---

Oddzielnego omówienia wymagają tzw. jąkające się piki (z ang. *stutter peaks*) [34 - 36, 38, 39, 45]. Są to artefakty odpowiadające od 5 do 10% powierzchni allelu specyficznego powstające na skutek pominięcia w czasie amplifikacji przez polimerazę DNA jednego powtórzenia z sekwencji rdzeniowej, co w efekcie skutkuje pojawieniem się produktu krótszego o 4 pary zasad w przypadku sekwencji STR o czteronukleotydowych powtórzeniach [34, 39]. Przyczyną powstawania pików jąkających się mogą też być właściwości polimerazy polegające na dołączaniu dodatkowych reszt adenozynowych na końcu sekwencji, a jedną z dających najmniejsze piki niespecyficzne jest polimeraza Gold (Applied Biosystems) stosowana w niniejszej pracy [56]. Wystąpienie jąkającego się piku jest szczególnie problematycznym zjawiskiem w sytuacji, gdy pik informatywny dla biorcy ma dokładnie tę samą wielkość co niespecyficzny pik występujący u dawcy. U biorcy po allogenicznej transplantacji, obserwując pik w położeniu specyficznym dla biorcy nie można wówczas jednoznacznie rozstrzygnąć czy jest to pik specyficzny czy też artefakt albo czy mamy do czynienia z ich współmigracją a w konsekwencji jaki jest udział każdego z nich. Badacze [39, 46] sugerują, żeby, jeżeli to tylko możliwe, wykluczać z analizy takie allele, które współmigrują z pikiem jąkającym się.

W badaniach przeprowadzonych w celu poznania ludzkiego genomu stwierdzono, że znajduje się w nim ponad  $10^4$  sekwencji STR [46]. Potencjalnie, każda z tych sekwencji może być użyta do badania chimeryzmu hematopoezy przy pomocy reakcji PCR. Warunkiem koniecznym i wystarczającym jest występowanie w tej sekwencji polimorfizmu długości uzyskiwanych produktów. W świetle powyższych faktów interesującym było dokonanie oceny przydatności wybranych sekwencji STR do oceny chimeryzmu hemopoezy w badanej populacji osób poddanych allogenicznej transplantacji w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ.

Efektom badań było wykrycie różnic w 57% przebadanych układów (od 17 w *locus* D17S1290 do 26 w *locus* D20S481). Nie stwierdzono jednak zależności pomiędzy ilością alleli, które potencjalnie mogą wystąpić w danej sekwencji a ilością różnic odnalezionych w układach biorca/dawca. Do oceny chimeryzmu hemopoezy w prowadzonych badaniach wybrano 75 sekwencji informatywnych (najczęściej *loci* D20S480 i D4S2366 częstotliwość 17,4%). W 97,4% par biorca / dawca uzyskano dwie informatywne sekwencje STR. Tylko w jednej parze ocenę chimeryzmu prowadzono w oparciu o 1 sekwencję STR. W prowadzonych badaniach nie wykazano żadnej zależności między ilością alleli występujących w danym *locus* genowym a częstotliwością zakwalifikowania danej sekwencji jako informatywnej. Ponieważ ustalanie profilu genetycznego zakończone wyborem sekwencji informatywnej jest czynnością pracochłonną i kosztowną wyniki powyższych badań stanowią

---

wskazówkę co do kolejności amplifikacji sekwencji STR w populacji osób poddanych allogeniczej transplantacji w Klinice Hematologii CMUJ.

W publikacji autorstwa Dubovsky i wsp. [29] we wszystkich parach uzyskano dwie sekwencje informatywne. Najczęściej występującą była sekwencja STR związana z *locus* D4S2366 co zgadzało się z wynikiem uzyskanym w badaniach prowadzonych w niniejszej pracy. Najrzadziej klasyfikowana jako informatywna była sekwencja D20S481, która w niniejszej pracy występowała najczęściej. W omawianej publikacji nie stwierdzono także zależności między ilością alleli a częstotliwością uznawania sekwencji za informatywną. Podsumowując, rozbieżności stwierdzone w częstotliwości zarówno występowania różnic w profilach między biorcą a dawcą jak i kwalifikowania sekwencji STR jako informatywnej wynikają głównie ze zmienności występującej między grupami etnicznymi objawiającymi się występowaniem odmiennych alleli [66] stwierdzono bowiem, że dziedziczenie sekwencji STR przebiega zgodnie z prawami Mendla [46]. Kolejną przyczyną może być bliskie pokrewieństwo między biorcą a dawcą. Innym, jak się wydaje ważniejszym powodem jest jednak to, że w przypadku publikacji Dubovsky i wsp. [29] przeanalizowano 20 sekwencji STR, z których następnie wybrano 7 pasujących najlepiej do analizowanej populacji. W niniejszej pracy posłużono się natomiast wyłącznie powyższymi 7 sekwencjami nie dokonując wcześniej selekcji z większej grupy sekwencji STR pod względem najlepszego dopasowania do badanej populacji.

### 5.3 Chimeryzm hematopoetyczny

Z zagadnieniem czułości oraz ograniczeń jakimi obarczone są metody oceny chimeryzmu wiąże się kwestia ustalenia poziomu chimeryzmu hematopoetycznego granicznego dla rozróżnienia między całkowitym (CC) a mieszanym (MC) chimeryzmem.

W niniejszej pracy określenie całkowitego chimeryzmu dawcy (metoda STR-PCR) przyjęto zgodnie z poglądem przedstawionym przez Gardinera [49]. Wprowadził on następującą nomenklaturę:

- chimeryzm dawcy, 95 – 100% komórek ma genotyp dawcy
- mieszany chimeryzm z przewagą komórek dawcy, 90 – 95% komórek ma genotyp dawcy

- 
- mieszany chimeryzm, 10 – 90% komórek ma genotyp biorcy
  - mieszany chimeryzm z przewagą komórek biorcy, powyżej 90% komórek ma genotyp biorcy.

Na powyższe określenia należy bowiem patrzeć przez pryzmat czułości i specyficzności metody oceny chimeryzmu hematopoetycznego. Taki pogląd znajduje zwolenników [46, 57, 69, 71], którzy jako wartość graniczną dla rozróżnienia mieszanego i całkowitego chimeryzmu hemopoetyzy przyjęli czułość reakcji i określili ją na poziomie 1-5%.

W większości przeanalizowanych publikacji [29, 35, 59, 68, 72, 73, 74] napotyka się określenie według którego całkowitą chimera hematopoetyczną jest osoba, u której stwierdzono czysty genotyp dawcy, czyli w czasie badania chimeryzmu identyfikowane jest DNA pochodzące wyłącznie z komórek dawcy. Jest to również zgodne z wytycznymi Europejskiej Grupy ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku Kostnego (EBMT – European Group of Blood and Bone Marrow Transplantation) [75]. Według tych źródeł ze zjawiskiem mieszanego chimeryzmu mamy do czynienia wtedy gdy w badanym materiale wykryto, niezależnie od stwierdzonej proporcji, genotyp charakterystyczny dla dawcy i dla biorcy allogenicznej transplantacji. Powyższe rozumowanie zastosowano w niniejszej pracy do oceny wyników uzyskanych przy pomocy metody RQ-PCR.

Według autorki niniejszej pracy większą zgodność z praktyką wykazuje pogląd prezentowany przez Gardinera. Uwzględnia on bowiem ograniczenia i czułość metody wybranej do oceny chimeryzmu. W przypadku określeń zaproponowanych przez EBMT ten sam materiał w zależności od czułości zastosowanej metody może zostać oceniony jako zawierający tylko materiał dawcy (CC) lub także biorcy jeżeli stosuje się metodę o większej czułości. Określenie to zakłada, że dysponujemy metodą o bardzo dużej czułości np RQ-PCR.

#### **5.4 Metoda ilościowej oceny chimeryzmu hematopoetycznego (RQ-PCR) - jej zalety i ograniczenia**

Druga metoda, przy pomocy której oceniano chimeryzm hematopoetyczny była oparta na zastosowaniu ilościowej reakcji PCR (RQ-PCR) przeprowadzanej w czasie rzeczywistym

W niniejszej pracy doktorskiej wybrano 11 sekwencji, zaliczanych do grupy ludzkich dwuallelicznych polimorfizmów w postaci krótkich insercji / delecji o wysokim stopniu heterozygotyczności [43]. Modyfikacja metody dokonana w niniejszej pracy polegała na zredukowaniu ilości matrycy używanej w reakcji RQ-PCR (DNA genomowego) i zastosowaniu chemii SYBR green w zamian za chemię TaqMan.

---

Zastosowana ilość DNA została dobrana na drodze eksperymentalnej i odpowiadała około 18 000 komórek diploidalnych. Jest ona mniejsza niż ta zaproponowana przez Maasa i wsp. [42] oraz Alizadeh i wsp [43]. W jej wyborze kierowano się z jednej strony kryterium ilości materiału genetycznego możliwego do uzyskania z próbki pobranej w czasie okresu potransplantacyjnego, a z drugiej strony ilością DNA odpowiadającą reprezentatywnej populacji komórek. Najpełniej postawione powyżej kryteria były spełnione przy amplifikacji 150ng DNA w 25 µl mieszaniny reakcyjnej. Wybrana ilość DNA pozwalała na uzyskanie krzywych standardowych o odpowiedniej wartości współczynnika nachylenia prostej [76] odzwierciedlającym wydajność reakcji na poziomie identycznym z uzyskaną w eksperymencie Alizadeh i wsp. [43]. Przeliczenie wykonane zgodnie z proporcją przedstawioną w publikacji źródłowej wskazało, że uzyskana czułość reakcji pozwalała na wykrycie 5 – 6 kopii DNA w badanym materiale natomiast w przypadku Alizadeh i wsp. [43] wykrywano 37 kopii DNA.

Pomimo tego, że ocena ilości produktu oparta o amplifikację produktu PCR w obecności sond molekularnych (tzw. chemia TaqMan) cechuje się większą specyficznością wyniku dokonano modyfikacji w postaci zastosowania chemii Syber green, która pozwoliła na uzyskanie zadowalających wyników. Na wybór chemii służącej ilościowej ocenie produktu wpłynęły następujące czynniki: metodę ilościową wykorzystywano do retrospektywnej analizy badanego materiału, opracowanie powyższej metody miało na celu wykonanie badania przesiewowego dla analizowanej populacji osób po transplantacji allogeniczej, które miało pomóc w wyborze sekwencji najczęściej różnicujących biorcę i dawcę spośród 11 wybranych. Wybór podyktowany był także względami ekonomicznymi. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że różnice w częstotliwości występowania poszczególnych sekwencji w populacji są bardzo niewielkie Ustalono jednak, że najczęściej, bo w 8/67 przypadkach sekwencji pozwalających na odróżnienie dawcy i biorcy, była to sekwencja zlokalizowana na chromosomie Y (S02), a najrzadziej (1/67) występowały sekwencje z chromosomu 17 (S09aFaR) i 11 (S11bFaR). Powyższe informacje mogą posłużyć jako wskazówka i sugerować kolejność wykonywania reakcji PCR w celu poszukiwania sekwencji pozwalających na rozróżnienie dawcy i biorcy. Stwierdzono również, że w badanej populacji sekwencje informatywne udało się odnaleźć w 88,1% przypadków (67/76) i jest to wielkość porównywalna z literaturą (90%) [43]. Analizowanie w toku prac układów par gdzie dawcą i biorcą przeszczepów były osoby spokrewnione (rodzeństwo) stanowiło dodatkowy czynnik utrudniający odnalezienie różnic w przypadku dwuallelicznego charakteru poszukiwanego polimorfizmu. W publikacji źródłowej panel

---

sekwencji ustalono dla sztucznie utworzonych mieszanych chimer. Podsumowując należy stwierdzić, że wybrany panel sekwencji dwuallelicznych można określić jako przydatny do oceny chimeryzmu hematopoetycznego.

## 5.5 Porównanie metod STR-PCR i RQ-PCR

W niniejszej pracy do oceny chimeryzmu hemopoezy wykorzystano dwie metody oparte na reakcji PCR półilościową (STR-PCR) i ilościową (RQ-PCR). Obie z nich można zastosować do wszystkich par biorców / dawców niezależnie od układu płci. Wybrane na podstawie publikacji [29, 43] zestawy starterów pozwoliły na rozróżnienie między biorcami i dawcami w większości analizowanych par, co wskazuje na możliwość zastosowania ich w praktyce klinicznej. W trakcie opracowania metod wykonano test mający na celu sprawdzenie liniowości i czułości powyższych metod. Uzyskane wyniki wskazały, że w obydwu przypadkach liniowość jest bardzo dobra, co oznacza bardzo dobrą korelację pomiędzy rozcieńczeniami uzyskanymi w eksperymencie seryjnych rozcieńczeń, a odczytem wskazań z aparatu (odpowiednio sekwenatora i RealTime). Test czułości wskazał, że RQ-PCR jest metodą o czułości większej o dwa rzędy w porównaniu do metody STR-PCR (brana jest pod uwagę czułość analityczna [77]).

RQ-PCR jest pod wieloma względami lepszą metodą służącą amplifikacji wybranego fragmentu DNA. Metody oparte na standardowej reakcji PCR o charakterze jakościowym, jaką jest STR-PCR, oceniają ilość produktu DNA w fazie plateau jego przyrostu, na którą ma wpływ wiele czynników. W przypadku ilościowej reakcji RQ-PCR pomiar ilości produktu ma miejsce w fazie eksponencjalnej, a ilość produktu jest wprost proporcjonalna do wyjściowej ilości docelowej sekwencji DNA. Ponadto reakcja STR-PCR jest oparta na zasadzie amplifikacji alleli dawcy i biorcy w tej samej próbówce, co powoduje wystąpienie zjawiska kompetycji o primery i różną efektywność amplifikacji fragmentów o różnej długości, a tym samym zaburzenie wyniku reakcji. W przypadku metody ilościowej allele charakterystyczne dla dawcy i dla biorcy są amplifikowane w oddzielnych reakcjach PCR, co chroni przed wystąpieniem zjawiska kompetycji o odczynniki. Metoda RQ-PCR jest również wolna od ograniczenia związanego z występowaniem niespecyficznych pików jakających się a także interferencji innych niespecyficznych sygnałów fluorescencyjnych. Co więcej użycie genu referencyjnego amplifikowanego w czasie tej samej reakcji RQ-PCR pozwala na dokładniejszą ocenę ilości docelowej sekwencji DNA niż ma to miejsce w przypadku konwencjonalnej reakcji PCR [41 - 43]



---

W niniejszej pracy przeprowadzono porównanie wyników oceny chimeryzmu hematopoezy uzyskanych przy pomocy tych dwóch metod. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w żadnym z analizowanych punktów czasowych po allogeniczej transplantacji niezależnie od rodzaju kondycjonowania poprzedzającego przeszczepienie. U poszczególnych pacjentów można stwierdzić jednak większą wiarygodność wyników uzyskanych przy pomocy metody RQ-PCR. Takim przykładem jest pacjent ZW (nr 39), u którego wszczepienie molekularne przy pomocy metody STR-PCR stwierdzono w 46 dobie po transplantacji natomiast wyniki uzyskane przy pomocy metody RQ-PCR wskazały na wcześniejsze wystąpienie wszczepienia. Drugim przykładem jest pacjentka AJ (nr 28), u której stwierdzono mieszany chimeryzm i towarzyszący mu nawrót choroby. Uzyskane wówczas wyniki wykazały rozbieżność. Przy pomocy metody STR-PCR wykazano mniejszy niż przy pomocy RQ-PCR udział dawcy w krwiotworzeniu. Zawyżenie udziału biorcy w krwiotworzeniu obserwowane w metodzie STR-PCR wynikało z jej ograniczeń, a w szczególności z obecności pików jakających się migrujących na wysokości pików specyficznych dla biorcy, jak i układów alleli, w których pik biorcy był mniejszy a tym samym ulegał efektywniejszej amplifikacji.

Pomimo niezaprzeczalnych zalet metody RQ-PCR, przede wszystkim bardzo dużej czułości, wydaje się, że obserwowane rozbieżności z wynikami uzyskanymi metodą STR-PCR nie są istotne i nie mają większego wpływu na ocenę przydatności obu metod. Można poddać analizie czy stwierdzenie w danej próbce przy pomocy metody STR-PCR całkowitego chimeryzmu hemopoezy dawcy na poziomie 100%, a przy pomocy metody RQ-PCR na poziomie 99,9% ma istotnie znaczenie w praktyce klinicznej. Przy pomocy metody o tak dużej czułości i przy takim wyniku można wykryć, że w badanej próbce mamy do czynienia na przykład z rozszczepionym chimeryzmem lub mieszanym chimeryzmem ograniczonym do pewnych populacji komórkowych i wynik powyższy może wskazywać na zasadność zbadania chimeryzmu w subpopulacjach. W przypadku metody STR-PCR badanie wykonane w populacji niefrakcjonowanych leukocytów wskazujące na 100% udział dawcy w krwiotworzeniu nie zasygnalizuje możliwości występowania chimeryzmu rozszczepionego lub mieszanego w subpopulacjach. Tym samym spowoduje zamaskowanie tych zjawisk do czasu pogłębienia się stopnia mieszanego chimeryzmu lub powrotu do genotypu biorcy w poszczególnych subpopulacjach.

Ocena chimeryzmu przy pomocy metody RQ-PCR w jednym punkcie czasowym wymaga sporządzenia dwóch krzywych standardowych w dubletach (dla sekwencji charakterystycznych dla dawcy i dla biorcy), wykonania w dubletach: reakcji dla sekwencji

---

specyficznosci dla dawcy i dla biorcy, genu GAPDH oraz kontroli negatywnej. Ocena chimeryzmu przy pomocy reakcji STR-PCR wymaga wykonania 6 reakcji PCR. Procedura ta jest mniej czaso- i pracochlonna oraz zdecydowanie tańsza.

W przypadku metody STR-PCR i RQ-PCR amplifikacje DNA genomowego wszystkich docelowych sekwencji przeprowadzano w tej samej temperaturze, co kwalifikuje obie metody jako dobre metody diagnostyczne. Umozliwia to bowiem równoczesna ocene chimeryzmu hematopoezy u kilku pacjentów niezaleznie od przyporzadkowanego im jako informatywne *locus* genowego, co wplywa na skrócenie czasu wykonywania badania. Waznym czynnikiem jest to, iz metoda STR-PCR jest powszechnie stosowana i polecana do oceny chimeryzmu hematopoetycznego [47, 63, 75], natomiast metoda ilosciowa wymaga dalszej standaryzacji. Jednakze w ocenie autorki niniejszej pracy jest to rowniez metoda w pelni wiarygodna. Obie metody cechuje rowniez zadowalajaca czulość, specyficznosc i powtarzalnosc oznaczen.

Biorac pod uwage przeslanki ekonomiczne oraz pracochlonnosc wykonania oznaczenia chimeryzmu przy pomocy metody RQ-PCR, a z drugiej strony brak istotnych rozbieznosci pomiedzy wynikami uzyskanymi przy pomocy obu metod jako bardziej przydatna w praktyce klinicznej wybrano metode STR-PCR.

## **5.6 Szpik kostny a krew obwodowa – znaczenie wyboru zrodla komorek w ocenie chimeryzmu hematopoezy**

Kolejnym niezmiernie waznym zagadnieniem wplywajacym na czulość zastosowanych metod i jakość informacji plynacej z oceny chimeryzmu hemopoezy jest zrodlo komorek hematopoetycznych. Kluczowa kwestia przed przeprowadzeniem allogenicznej transplantacji jest okreslenie profili genetycznych dawcy i biorcy ze wskazaniem na roznice w nich wystepujace. W niniejszej pracy podstawowym zrodlem komorek sluzacych takiej ocenie byly jadrzaste komorki pochodzace z krwi obwodowej. To zrodlo jest polecane w literaturze [29, 36, 50, 53, 68]. Dostarcza ono odpowiednio duzej ilosci DNA dobrej jakości wystarczajacej do biezacych analiz, a takze do wykonania pozniejszych izolacji. Do alternatywnych zrodel genomowego DNA wykorzystywanych do ustalenia profilu genetycznego naleza wymaz z policzka [58], ktory wykorzystywano trzykrotnie oraz cebulki wlosowe [53].

W niniejszej pracy badania wykonywano wykorzystujac zarowno krew obwodowa jak i szpik kostny. W celu sprawdzenia ewentualnych roznic w czulości wynikow chimeryzmu hematopoezy uzyskiwanych ze szpiku i krwi przeprowadzono porownanie miedzy wartosciami

---

uzyskanymi w określonym czasie po allogeniczej transplantacji. Z przeprowadzonych badań wynika, że nie ma istotnych statystycznie różnic pomiędzy wynikami oceny chimeryzmu hematopoezy uzyskiwanymi z obu źródeł, niezależnie od wybranej metody. Również różnice pomiędzy grupami chorych poddanych kondycjonowaniu niemieloablacyjnemu i ablacyjnemu nie były istotne statystycznie. Wskazuje to na zbliżony stopień informatywności wyniku uzyskanego z krwi i szpiku. W pojedynczych przypadkach stwierdzano jednak różnice między wynikiem uzyskanym w szpiku i krwi. U pacjentki BW (nr 23) wszczepienie ocenione we krwi było opóźnione w stosunku do wszczepienia ocenionego w szpiku. U pacjentki AH (nr 32) w 90 dobie po przeszczepieniu stwierdzono całkowity chimeryzm dawcy we krwi obwodowej natomiast w szpiku kostnym udział dawcy w krwiotworzeniu oceniono na poziomie około 50%. W obu przypadkach tylko wynik uzyskany ze szpiku był zgodny z sytuacją kliniczną pacjenta, a tym samym był bardziej wiarygodny. Zdaniem autorki badanie chimeryzmu hematopoezy należy wykonywać głównie szpiku kostnym, pomimo konieczności zmniejszenia częstotliwości badań ze względu na mniejszą dostępność szpiku niż krwi.

Istnieją rozbieżności dotyczące zalecanego materiału do badania chimeryzmu w okresie potransplantacyjnym. Część badaczy poleca krew obwodową [36, 45, 50, 53, 56, 64, 78], inni szpik kostny [58], jeszcze inni obydwie źródła [39, 59, 64, 66, 72, 79].

Na wybór materiału badawczego wpływ ma, np. czas jaki upłynął od momentu transplantacji. Jeżeli badanie wykonywane jest wcześniej po transplantacji, kiedy to ilość komórek jądrzastych w mikrolitrze jest niewielka, a częstotliwość badań jest wzmożona zalecanym źródłem komórek hematopoetycznych jest krew obwodowa. W późniejszym okresie, kiedy częstotliwość badań ulega zmniejszeniu, istnieje możliwość badania chimeryzmu hematopoezy we krwi obwodowej i w szpiku kostnym.

Dużą rozbieżność w ocenie chimeryzmu we krwi i szpiku w pojedynczych przypadkach obserwowali Wang i wsp. [66] (100% *versus* 60%) Cignani i wsp. [80] oraz Mattson i wsp. [81]. Według nich może dziać się tak dlatego, że allogeniczne komórki macierzyste proliferują w różnym stopniu w zależności od otaczającego je środowiska (szpik kostny lub krew obwodowa). Innym wytłumaczeniem dla zjawiska wystąpienia mieszanego chimeryzmu tylko w szpiku kostnym może być: kontaminacja szpiku prawidłowymi komórkami podścieliska pochodzącymi od biorcy [66, 78, 81], zła aspiracja szpiku lub błędy powstałe w czasie obróbki materiału już po pobraniu [81]. Na podstawie powyższej obserwacji autorzy twierdzą również, że badanie chimeryzmu hematopoezy we krwi obwodowej, nawet w krótkich odstępach czasu, może nie pozwalać na wykrycie nawrotu u wszystkich pacjentów. Jeśli w przeprowadzonym

---

badaniu zostanie wykryty mieszany chimeryzm istotne jest stwierdzenie, czy występuje on we wszystkich czy tylko w niektórych liniach komórkowych.

### 5.7 Wczesne zmiany chimeryzmu hematopoezy – wszczepienie molekularne

Badanie chimeryzmu hematopoezy jest wykorzystywane do rutynowej oceny wszczepienia materiału przeszczepowego.

Jednym z celów niniejszej pracy było zbadanie i przeanalizowanie zagadnienia wczesnych zmian kinetyki chimeryzmu hematopoezy. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na występowanie we wczesnym okresie potransplantacyjnym stanu mieszanego chimeryzmu niemal u wszystkich pacjentów, niezależnie od rodzaju kondycjonowania. Porównano także poziom chimeryzmu hematopoetycznego dawcy w poszczególnych dobach po allogeniczej transplantacji w grupie pacjentów po alloHSCT i alloNMSCT. Znacząco statystycznie niższy udział hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu w grupie pacjentów poddanych alloHSCT obserwowano tylko w 2 dobie po transplantacji. Od 6 doby po transplantacji obserwowano, że choć w sposób nieistotny statystycznie, udział hematopoezy dawcy był wyższy w grupie pacjentów poddanych alloHSCT. Prawdopodobnym wyjaśnieniem sytuacji zaistniałej tuż po transplantacji może być rodzaj zastosowanych warunków chemioterapii kondycjonującej. Być może bardziej agresywne kondycjonowanie mieloablacyjne uszkadza podścielisko szpiku kostnego utrudniając zagnieżdżenie podanych komórek macierzystych dawcy, co powoduje opóźnienie w pojawieniu się powstających *de novo* komórek dawcy [11]. Innym czynnikiem mogącym mieć wpływ na tę sytuację jest ilość komórek macierzystych CD34+ podanych w materiale przeszczepowym. Dane wskazują, że połowie pacjentów poddanych alloHSCT podano ilość komórek mniejszą niż zalecana, natomiast w grupie po alloNMSCT 80% pacjentów otrzymało prawidłową ilość komórek CD34+ [3, 4, 82, 83]. Wykazano również odmienną kinetykę zmian udziału hematopoezy dawcy w krwiotworzeniu w grupie poddanej alloHSCT i alloNMSCT. W grupie pacjentów poddanych alloHSCT kinetyka przyrostu najlepiej koreluje z trendem logarytmicznym, a w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT kinetyka najlepiej odpowiada trendowi liniowemu. Przebieg kinetyki uzyskany w grupie pacjentów poddanych alloHSCT obrazuje początkowo gwałtowne wypieranie hematopoezy biorcy aby w późniejszej fazie osiągnąć plateau i pozostać w zakresie całkowitego chimeryzmu dawcy. Z powodu uszkodzeń spowodowanych w komórkach hematopoetycznych biorcy przez chemioterapię mieloablacyjną komórki hematopoetyczne dawcy bardzo szybko dominują w układzie krwiotwórczym i

---

immunologicznym biorcy [11]. Przebieg kinetyki uzyskany w grupie pacjentów poddanych alloNMSCT odzwierciedla stopniowe i równomierne zastępowanie hematopoezy biorcy przez hematopoezę dawcy wywodzącą się z zagnieżdżających się komórek z materiału przeszczepowego. Stan mieszanego chimeryzmu występuje przez dłuższy czas niż w przypadku alloHSCT, gdyż niemieloablacyjne warunki kondycjonowania umożliwiają przeżycie większej ilości mniej uszkodzonych komórek biorcy. Kondycjonowanie niemieloablacyjne ma działanie immunosupresyjne, indukuje immunotolerancję i nie powoduje nieodwracalnej aplazji szpiku kostnego [3].

W praktyce klinicznej możliwe jest wystąpienie czystego genotypu dawcy już w 1 dniu po transplantacji. W niniejszej pracy obserwowano wystąpienie tego zjawiska u jednej pacjentki (KG nr 41). Jego przyczyn można upatrywać w schorzeniu podstawowym, którym była ciężka anemia aplastyczna (vSAA). Choroba ta objawia się ubogokomórkowym szpikiem bez występowania populacji komórek nowotworowych. Stąd można wnioskować, że w tym konkretnym przypadku w pierwszych dniach po transplantacji komórki hematopoetyczne dawcy przejęły całkowicie funkcje układu krwiotwórczego i immunologicznego w organizmie biorcy.

Dubovsky i wsp. [29] stwierdzili, że próbki krwi obwodowej pobrane w czasie pierwszej doby po transplantacji i w okresie do wszczepienia hematologicznego, a nawet dłużej często wykazują mieszany chimeryzm hematopoetyczny wskazujący na obecność resztkowych komórek biorcy i krążących komórek dawcy. Dokładniejsza analiza prowadzona w subpopulacjach komórkowych wyizolowanych przy pomocy cytometrii przepływowej dowiodła, że w większości przypadków mieszany chimeryzm był spowodowany uporczywą obecnością limfocytów T biorcy o fenotypie CD4+ lub/i CD8+. Komórki te są znane ze zdolności do przetrwania nawet intensywnej chemioterapii używanej podczas standardowego kondycjonowania [13, 50]. Stwierdzono również, że przyczyną powstania mieszanego chimeryzmu są także komórki krwi obwodowej o fenotypie CD34+ pochodzące od biorcy, reprezentujące populację uszkodzonych komórek macierzystych. Różniły się one morfologicznie od prawidłowych komórek macierzystych i nie wykazywały zdolności do klonogenności.

Wszczepienie molekularne (ME z ang. *molecular engraftment*) jest definiowane jako pierwsze wystąpienie dominacji specyficznego dla dawcy wzoru allelicznego w materiale genetycznym uzyskanym z całkowitych leukocytów krwi obwodowej po allogenicnej transplantacji [29, 84 – 86]. Definicja ta jednak nie określa jednoznacznie poziomu chimeryzmu dawcy potrzebnego do stwierdzenia ME. Zjawisko to może poprzedzać nawet

---

o około 7 dni przyjęcie się przeszczepu oceniane według kryteriów hematologicznych. Badania wskazują, iż u pacjentów, u których nie stwierdzono do +14 doby po transplantacji ME nie dochodziło do wszczepienia hematologicznego, co w konsekwencji rodziło potrzebę wykonania ponownej transplantacji.

W pracy przeprowadzono porównanie czasu wystąpienia wszczepienia molekularnego i hematologicznego. Jeżeli przyjęto definicję wszczepienia molekularnego zaprezentowaną w literaturze [29] zarówno w grupie po alloHSCT jak i po alloNMSCT wykazano znacząco wcześniejsze wystąpienie ME niż wszczepienia hematologicznego, było to zgodne z innymi badaniami [29]. Jeżeli jako dobę wszczepienia molekularnego przyjęto osiągnięcie CC nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w żadnej z grup. Uzyskany wynik w głównej mierze wskazuje na czułość oznaczeń chimeryzmu hematopoezy przy pomocy metody STR-PCR, która jest większa niż czułość metody używanej do oceny morfologii krwi, a ponadto pozwala na stwierdzenie czy komórki pochodzą z komórek macierzystych dawcy czy biorcy. Shimoni i wsp [13] dowodzą, że w momencie wystąpienia wszczepienia hematologicznego zazwyczaj nadal obserwuje się stan mieszanego chimeryzmu hematopoezy. Savage i wsp. [87] twierdzą, że osiągnięcie całkowitego chimeryzmu dawcy następuje u dorosłych do 3 miesięcy po transplantacji.

W niniejszej pracy doktorskiej u każdego biorcy dobę osiągnięcia CC porównywano z ilością komórek CD34+ podanych w materiale przeszczepowym. W oparciu o dane literaturowe [3, 4, 82, 83], jako wartość graniczną przyjęto  $3 \times 10^6$  komórek CD34+/kg masy ciała biorcy. Z przeprowadzonych badań wynika, że wszczepienie molekularne nastąpiło szybciej niezależnie od rodzaju transplantacji u chorych, którym podano zalecaną ilość komórek CD34+. Uzyskane rezultaty nie różnią się od obserwacji przeprowadzonych w innych ośrodkach, które dowodzą że zwiększenie ilości komórek CD34+ w materiale przeszczepowym przyspiesza odbudowę hematologiczną [82].

W niniejszej pracy oceniono także wpływ źródła macierzystych komórek hematopoetycznych na czas wystąpienia ME. Badanie wykazało, że w obu typach transplantacji wszczepienie molekularne nastąpiło szybciej w grupie pacjentów, którym podano alloPBSCT, jednak nie była to różnica istotna statystycznie. Według badań podanie hematopoetycznych komórek macierzystych uzyskanych z krwi obwodowej skutkuje szybszym wszczepieniem i szybszą odbudową immunologiczną [4, 83], a także mniejszą częstotliwością występowania mieszanego chimeryzmu [88]. Na wszczepienie molekularne ma wpływ także ilość komórek macierzystych w materiale przeszczepowym [80]. Brak istotności statystycznej mógł być więc

---

związany z różnicami w ilości podanych komórek CD 34+.

## **5.8 Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego w późnym okresie potransplantacyjnym**

Znaczenie badania chimeryzmu różni się w zależności od czasu jaki upłynął od transplantacji. W okresie potransplantacyjnym można wyróżnić trzy fazy: okres od przeszczepienia do wszczepienia hematologicznego, od wszczepienia do osiągnięcia całkowitego chimeryzmu dawcy i późny okres potransplantacyjny. Każdy z nich ma inną kinetykę chimeryzmu i inne znaczenie kliniczne [13].

W chwili utraty przeszczepu pojawia się problem znalezienia przyczyny zaistniałej sytuacji. Trudności następcza rozróżnienie między niewystarczającą funkcjonalnością szpiku kostnego będącej następstwem wystąpienia infekcji wirusa cytomegalii lub efektu toksycznego zastosowanej terapii, a wynikającą z odrzucenia przeszczepu lub nawrotu choroby podstawowej. W takich przypadkach ocena chimeryzmu hemopoetycznego dostarcza niezbędnych informacji. Jeżeli wynik badania wskaże na CC to przyczyny niewydolności szpiku należy upatrywać w toksyczności leczenia jednak jeżeli uzyskany wynik przyniesie informację o mieszanym chimeryzmie, to wiąże się on zazwyczaj z nawrotem choroby lub odrzuceniem przeszczepu [50, 89, 90].

### **5.8.1 Analiza chimeryzmu u chorych z nienowotworowymi schorzeniami układu hematopoetycznego**

Ze względu na identyczność mechanizmów immunologicznych rządzących zjawiskami związanymi z procesem przyjmowania się przeszczepu, jego odrzucania czy też utraty zarówno w przebiegu nowotworowych jak i nienowotworowych schorzeń układu krwiotwórczego, do badań w ramach niniejszej rozprawy włączono również pacjentów poddanych transplantacji z powodu ciężkiej anemii aplastycznej. Celem takiego postępowania było również ustalenie adekwatnej częstotliwości badania chimeryzmu hemopoetycznego u tych pacjentów.

W grupie pacjentów z vSAA włączonych do badania w żadnym przypadku nie doszło do odrzucenia przeszczepu. Największe ryzyko utraty przeszczepu stwierdzono u pacjentki KG (nr 41). Po początkowym wszczepieniu chimeryzm dawcy badany w pełnej krwi uległ załamaniu. Reakcją terapeutyczną było podanie czynnika wzrostu (G-CSF). Spowodowało to

---

powrót hematopoezy do poziomu 80% komórek dawcy w pełnej krwi. Pomimo utrzymującego się MC hematopoeza pacjentki działała prawidłowo.

Na szczególną uwagę zasługuje to, że właśnie na podstawie badań chimeryzmu hematopoezy określono wskazanie do podania czynnika wzrostu (G-CSF) pacjentce KG (nr 41). Takie działanie terapeutyczne prawdopodobnie zapobiegło nawrotowi choroby. W przeprowadzonych badaniach udowodniono, że podanie G-CSF stymuluje odbudowę granulocytarną [80].

U pacjentów cierpiących na niewydolność układu krwiotwórczego spowodowaną schorzeniem o podłożu nienowotworowym stan mieszanego chimeryzmu hematopoezy może być traktowany jako końcowy efekt transplantacji, gdyż jego osiągnięcie jest równoznaczne z uniezależnieniem pacjenta od podawania preparatów krwiopochodnych [13, 35, 91]. U tych pacjentów monitorowanie chimeryzmu służy głównie ocenie możliwości utraty przeszczepu i związanego z nim nawrotu choroby [35].

Bacigalupo [26] przedstawił badania dotyczące grupy kilku tysięcy pacjentów z SAA poddanych alloHSCT i alloNMSCT monitorowanych przez 30 lat. Spośród pacjentów, którzy przeżyli 65% wykazuje całkowity chimeryzm dawcy, 20% wykazuje stabilny mieszany chimeryzm, a 15% wykazało progresywny mieszany chimeryzm i powróciło do autologicznej hematopoezy. Stabilny mieszany chimeryzm nie zawsze wskazuje na możliwość nawrotu choroby lecz może obrazować wyciszoną tolerancję powstającą na pograniczu hematopoezy dawcy i biorcy bez objawów chorobowych i jest użyteczny do określenia optymalnego czasu podania leczenia jakim jest, na przykład infuzja limfocytów dawcy [70, 92].

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że u pacjentów z SAA głównym problemem występującym u 15 – 30% pacjentów jest odrzucanie przeszczepu [92]. Wykazano, że jeżeli u pacjentów z SAA stwierdza się wysoki poziom komórek biorcy (20 – 80%) i progresywny mieszany chimeryzm to jest to związane z odrzuceniem przeszczepu [93] zwłaszcza w okresie poprzedzającym lub w momencie odstawienia immunosupresji [75], natomiast niski poziom (2,5 – 25%) nie musi oznaczać odrzucenia przeszczepu [50, 94].

### **5.8.2 Analiza chimeryzmu u chorych z nowotworowymi schorzeniami układu krwiotwórczego**

Celem przeprowadzenia allogenicznej transplantacji, w przypadku wystąpienia hematologicznego schorzenia nowotworowego, jest eradykacja klonu nowotworowego



---

i osiągnięcie w układzie krwiotwórczym i immunologicznym pacjenta całkowitego chimeryzmu dawcy [28].

#### **5.8.2.1 Znaczenie monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego – infuzja limfocytów dawcy (DLI)**

Allogeniczna transplantacja hematopoetycznych komórek macierzystych jest w większości przypadków skuteczną terapią stosowaną u pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi układu krwiotwórczego. Po przeprowadzonej transplantacji w organizmie pacjenta działa bardzo silny efekt przeciwbiałaczkowy (GvL), w którym pośredniczą limfocyty T obecne w szpiku kostnym. Efekt GvL bierze udział w eradykacji choroby resztkowej i wspomaga osiągnięcie całkowitego chimeryzmu dawcy [24, 28]. Niestety u około 20-30% pacjentów dochodzi do nawrotu [4]. Jednym ze sposobów na uzyskanie stanu hematologicznej i molekularnej remisji jest podanie infuzji limfocytów dawcy, która daje efekt niemożliwy do osiągnięcia na drodze fizycznej eradykacji klonu nowotworowego poprzez zastosowanie mieloablacyjnych warunków kondycjonowania [28]. DLI może być traktowana również jako postępowanie zapobiegające wystąpieniu nawrotu [28].

Niestety ta adoptywna immunoterapia jest obarczona ryzykiem. Może ona powodować powikłania w postaci rozwoju ostrej lub przewlekłej postaci choroby GvHD i nieodwracalnej aplazji szpiku [4, 23, 24, 48, 95]. W ciągu roku śmiertelność po podaniu DLI wynosi 18% [4].

Niniejszej pracy przedstawiono jedynie 2 chorych (AH – AML-M4 oraz JSz - CML), u których zastosowano DLI. Powodzenie terapeutyczne obserwowano u jednego chorego, u którego tuż po podaniu DLI wystąpiło załamanie poziomu chimeryzmu dawcy (10%) ze względu na podaną równocześnie immunosupresję w postaci cyklosporyny. Jednakże w ciągu miesiąca po zaprzestaniu stosowania immunosupresji doszło do odwrócenia sytuacji i poziom chimeryzmu wzrósł do 90%, towarzyszyło mu uzyskanie remisji molekularnej.

Zarówno jeżeli wziąć pod uwagę czas potrzebny do osiągnięcia remisji jak i wynik zastosowanej terapii uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki nie odbiegają od danych literaturowych [4, 13, 23, 72]. DLI najefektywniej działa u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową [4]. Au i wsp [23] przedstawili przypadek pacjenta z AML-M4, któremu w czasie nawrotu po alloBMT podano chemioterapię, a jako skuteczną konsolidację zastosowano infuzję limfocytów dawcy.

---

Znajomość poziomu chimeryzmu hematopoezy jest niezbędna przy podejmowaniu decyzji o DLI. Jego ocena jest również niezbędna po wykonaniu DLI w celu przewidzenia odpowiedzi na zastosowaną terapię [13, 49, 57, 95]. Jeżeli przed wykonaniem infuzji w szpiku kostnym znajdują się komórki dawcy na poziomie wykrywalnym przy pomocy reakcji PCR, to wiąże się to z osiągnięciem hematologicznej a nawet molekularnej remisji bez ryzyka wystąpienia aplazji. Brak komórek dawcy koreluje natomiast z wystąpieniem ciężkiej mielosupresji. Badacze podkreślają, że nie udało się odnaleźć takiej korelacji jeżeli chimeryzm oceniano przy pomocy metod cytogenetycznych, analizy RLFP czy też Southern Blot i wiąże to zjawisko ze zbyt małą czułością powyższych metod [25, 48]. W oparciu o tę wiedzę prowadzono monitorowanie chimeryzmu przy pomocy metod wykorzystujących reakcję PCR. Należy również podkreślić, że wyniki chimeryzmu hematopoetycznego uzyskanej w niniejszej pracy były podstawą do podjęcia decyzji o wykonaniu DLI u przedstawionych powyżej pacjentów, a regularne badania chimeryzmu hematopoezy umożliwiały monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii.

Nie zostało jednoznacznie stwierdzone czy dla skuteczności podania DLI lepiej jeżeli w subpopulacji limfocytów T stwierdza się całkowity czy też mieszany chimeryzm hematopoetyczny [72, 96]. Wykazano, że nie ma istotnych statystycznie różnic w odpowiedzi na leczenie przy pomocy DLI między grupami pacjentów z CML o całkowitym i mieszanym chimeryzmie w subpopulacji limfocytów T w momencie podania DLI. Natomiast aplazja szpiku kostnego po DLI dominowała u pacjentów z MC w linii limfocytów T [4, 72].

Inni dowodzą, że tylko stan chimeryzmu w populacji komórek CD34+ wskazuje na wielkość rezerwuaru komórek dawcy przed podaniem DLI. Wykazano, że jeżeli poziom chimeryzmu dawcy w populacji komórek CD34+ jest wysoki to nie obserwuje się aplazji szpiku [31, 79, 97].

#### **5.8.2.2 Znaczenia monitorowania chimeryzmu hematopoezy w subpopulacjach komórkowych**

Jednym ze sposobów zwiększenia czułości i specyficzności uzyskiwanych wyników jest ocena poziomu chimeryzmu w subpopulacjach komórkowych izolowanych w czasie separacji pozytywnej przy pomocy przeciwciał sprzężonych z kuleczkami paramagnetycznymi [65, 98, 99] lub przy pomocy cytometrii przepływowej [58, 67, 98]. Działanie takie poprzedzające wykonanie reakcji PCR pozwala na zwiększenie czułości oznaczenia, według niektórych badaczy [81] o dwa rzędy wielkości, a według innych [52] o 3 lub nawet 4. Populacjami

---

komórkowymi o szczególnym znaczeniu są: granulocyty, monocyty, limfocyty T, limfocyty B, komórki macierzyste, komórki NK oraz komórki charakterystyczne dla danego typu nowotworu [52, 65, 95, 99, 100].

W niniejszej pracy doktorskiej badania chimeryzmu wykonywano jedynie w subpopulacji limfocytów T jako linii komórkowej o największym przewidywanym znaczeniu klinicznym. Oznaczenie to nie było wykonywane rutynowo, a jedynie w sytuacji wyraźnych wskazań klinicznych w celu zwiększenia czułości badania. Dlatego niemożliwe jest ustosunkowanie się w sposób oparty na statystyce do danych literaturowych i konieczne jest ograniczenie do przedyskutowania poszczególnych zaobserwowanych przypadków.

Pierwszy przykład dotyczy pacjentki GM (nr 30). W 237 dobie po alloNMSCT w wykonanym badaniu chimeryzmu hemopoezy stwierdzono udział dawcy na poziomie 72,3% w szpiku kostnym i 85,5% we krwi obwodowej. Udział hematopoezy dawcy w subpopulacji limfocytów T oceniono na 28,5%. Taki wynik sugerował możliwość wystąpienia nawrotu choroby podstawowej i stanowił podstawę do podania pacjentce czynnika wzrostu (G-CSF), który sprzyja granulopoezie [80]. W kolejnym badaniu uzyskano wyraźną poprawę parametrów.

Drugi przykład przedstawia pacjentkę AJ ze stwierdzoną AML-M2 (nr 28). W 60 dobie po allogenicznej transplantacji w wykonanym badaniu chimeryzmu w komórkach uzyskanych z pełnej krwi wykazano udział hematopoezy dawcy na poziomie sugerującym możliwość wystąpienia nawrotu i w jego następstwie wykonano badanie chimeryzmu w subpopulacji limfocytów T. Uzyskany wynik wskazywał na całkowity chimeryzm dawcy w populacji limfocytów T. Nawrót choroby nastąpił jednak w 138 dobie. Uzyskany wynik można interpretować dwojako. Po pierwsze być może wykonanie badania w subpopulacji komórek niosących w sobie pierwotnie transkrypt aml/eto dałoby wynik, który już wówczas wskazywałby na ryzyko nawrotu choroby. Po drugie przyczyn takiego wyniku można również upatrywać w dynamice schorzenia jakim jest ostra białaczka szpikowa. Wówczas wynik uzyskany w 60 dobie był wynikiem informatywnym, a nawrót choroby rozwinął się później.

Gonzalez i wsp. [52] oraz Antin i wsp. [35] podkreślają, że w większości przypadków kinetyka chimeryzmu obserwowana w wyizolowanych subpopulacji komórkowych nie jest możliwa do wykrycia w czasie badania chimeryzmu we frakcji całkowitych leukocytów. Liczebność subpopulacji jest bowiem niewielka i sygnał charakterystyczny dla biorcy obecny w danej subpopulacji ulega zagłuszeniu. Badacze nie zgadzają się z obserwacjami przeprowadzonymi przez Badera i wsp. [68], który dowodzi, że możliwe jest dokonanie korelacji między wzrastającym poziomem chimeryzmu biorcy oznaczanym w pełnych

---

leukocytach krwi obwodowej a nawrotem. Nie podzielają również twierdzenia, że detekcja mieszanego chimeryzmu na poziomie mniejszym niż 1% nie ma wartości dla przewidzenia nawrotu. Jeżeli badanie chimeryzmu wykonuje się w sortowanych subpopulacjach czułość metody STR-PCR wzrasta do 0,1 – 0,01%, co odzwierciedla możliwość wykrywania komórek biorcy na takim poziomie. Według ich doświadczeń wykrycie uporczywie utrzymującego się chimeryzmu biorcy na takim poziomie daje przesłanki do wnioskowania o nawrocie, który często występuje po 3 – 6 miesiącach, natomiast badania prowadzone w tym samym czasie w pełnych leukocytach nie wykazują żadnych zmian.

Najczęściej badaną populacją komórkową są limfocyty T. Są one ważne przy wszczepieniu, gdyż duża ilość interleukin produkowanych przez limfocyty T jest pomocna w procesie proliferacji i różnicowania komórek macierzystych oraz mogą one ochraniać przeszczep wykorzystując swoje własności supresorowe lub cytotoksyczne [98]. Limfocyty T są także populacją pośredniczącą w wystąpieniu efektu HvG i GvH [21, 24, 35, 98, 101]. Obserwacja kinetyki chimeryzmu w tej subpopulacji może stać się podstawą do podjęcia decyzji o zaprzestaniu leczenia immunosupresyjnego, podaniu DLI lub drugiej allogeniczej transplantacji [13, 24, 79, 102].

Nie ma jednoznacznych poglądów co do zależności między poziomem chimeryzmu hemopoezy w subpopulacji komórek CD3+ a nawrotem choroby podstawowej. Niektórzy badacze [13, 29, 52, 95, 103] wykazali, że mieszany chimeryzm w linii limfocytów T może faworyzować nawrót na drodze ustanowienia tolerancji w stosunku do komórek biorcy, które unikają działania efektu GvL. Wynik badania chimeryzmu w linii CD3+ nie jest zaburzany przez komórki linii mieloidalnej reprezentujące chorobę resztkową. Jeżeli w tej subpopulacji wystąpi MC to jest on związany z nawrotem, jeżeli CC to uprzedza wystąpienie GvL związanego w przeważającej części przypadków z GvHD.

Znaczenie monitorowania chimeryzmu w linii limfocytów T jest jednak podważane [52, 78, 95, 97, 99]. Badacze twierdzą, że mieszany chimeryzm hematopoetyczny w limfocytach T nie wykazuje korelacji z nawrotem choroby podstawowej. Odzwierciedla on jedynie stan obwodowej ekspansji dojrzałych limfocytów T pochodzących ze wszczepionego szpiku kostnego w czasie rekonstrukcji immunologicznej, gdyż limfocyty T mogą przeżyć nawet intensywne kondycjonowanie.

W literaturze badanie chimeryzmu hemopoezy jest prowadzone także w innych populacjach komórkowych [65, 67, 95, 104]. Badacze [35, 99] uważają, że sposobem na uzyskiwanie wiarygodnych wyników jest badanie chimeryzmu w kilku subpopulacjach komórkowych równocześnie (komórki mieloidalne, limfocyty T i B, komórki NK) i że nie

---

można na podstawie jednej subpopulacji wyciągać wniosków co do stanu chimeryzmu w pozostałych [65].

Inna hipoteza mówi, że monitorowanie chimeryzmu należy prowadzić w linii komórek niosących ze sobą zaburzenie genetyczne leżące u podłoża wystąpienia białaczki, gdyż wówczas mieszany chimeryzm wykryty w subpopulacjach komórek pierwotnie białaczkowych poprzedza nawrót o około 3 – 6 miesięcy [29, 52, 65, 73, 78].

Bardzo ciekawą metodę monitorowania chimeryzmu hemopoezy zaproponował Wu [91]. Jest ona możliwa do zastosowania u pacjentów z wrodzonymi hemoglobinopatiami. Ocena chimeryzmu hematopoezy jest prowadzona w linii erytroidalnej i pozwala nie tylko na zbadanie poziomu chimeryzmu ale również na ocenę zdolności wszczepionych komórek do funkcjonowania w organizmie biorcy.

W świetle powyższych informacji widać wyraźnie, że badanie chimeryzmu w subpopulacjach komórkowych staje się kluczem do zrozumienia zdarzeń mających miejsce po transplantacji.

### **5.8.2.3 Monitorowanie chimeryzmu hematopoezy a ocena choroby resztkowej**

Zgodnie z obowiązującą definicją remisja białaczki jest stwierdzana, gdy odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym oceniany przy pomocy metod morfologicznych spada poniżej 5%. Nawet po spełnieniu tego kryterium pozostaje znaczna ilość komórek białaczkowych [67]. Podstawową metodą molekularną służącą monitorowaniu choroby resztkowej jest PCR poprzedzona wykonaniem reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) [46]. Dwuetapowość tej procedury czyni ją bardzo podatną na wystąpienie kontaminacji. W porównaniu do niej metoda STR-PCR jest stosunkowo łatwą, a zarazem czułą techniką, która może zostać użyta do monitorowania wszystkich pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji. Wiadomo, że [52, 57, 99] wynik badania chimeryzmu hemopoezy nie pozwala w sposób jednoznaczny i bezpośredni na wykrycie obecności komórek nowotworowych i monitorowanie choroby resztkowej. Zaobserwowane zmiany w kinetyce chimeryzmu hematopoezy pozwalają jednak na oznaczenie pewnych niepokojących objawów, takich jak rozwój MC, który może być, choć nie musi [52, 57, 99], związany z nawrotem choroby.

W niniejszej pracy zaobserwowano całkowitą zgodność wyników chimeryzmu hematopoetycznego z wynikami monitorowania choroby resztkowej u pacjentów z CML.

W literaturze podkreśla się, że RT-PCR jest najczulszą metodą stosowaną do monitorowania choroby resztkowej ale u pacjentów z CML badanie chimeryzmu hemopoezy

---

stanowi doskonały test przesiewowy. Jeśli stwierdzi się obecność resztkowych komórek biorcy pacjent powinien być poddany ocenie obecności translokacji bcr/abl. Dowiedziono, że wystąpienie chimeryzmu dawcy u pacjentów z CML jest równoznaczne z eliminacją choroby resztkowej i wejściem pacjenta w stan remisji molekularnej [25, 30, 32, 36, 49, 55, 99].

W niniejszej pracy analizie poddano zgodność wyników monitorowania chimeryzmu choroby resztkowej u pacjentów z ostrymi białaczkami. Przykładem może być przypadek pacjentki AJ (nr 28) z AML-M2. Do 120 doby po transplantacji obserwowano u niej całkowity chimeryzm dawcy. Przy pomocy metody RT-PCR już od 88 dobie po transplantacji wykrywano obecność translokacji aml/eto. Pierwszą informację o wystąpieniu mieszanego chimeryzmu uzyskano w 147 dobie. Wynik ten sugeruje, że najprawdopodobniej gdyby oceny chimeryzmu dokonano w populacji komórkowej pierwotnie zajętej przez proces chorobotwórczy to MC wykryto by wcześniej.

W literaturze funkcjonują dwa odmienne poglądy na to, czy stwierdzenie MC u pacjentów z ostrymi białaczkami jest równoznaczne z wykryciem choroby resztkowej. W większości przypadków można znaleźć taką zależność [13, 28, 68, 104 - 106] ale istnieją doniesienia świadczące o jej braku [30, 36, 53, 81]. Obserwowano zarówno remisję choroby w sytuacji narastającego mieszanego chimeryzmu [53] jak i wystąpienie nawrotu w sytuacji całkowitego chimeryzmu [36]. Podstawową przyczyną takiej niejednoznaczności uzyskiwanych wyników może być bardzo krótki czas rozwoju nawrotu u pacjentów z ostrymi białaczkami w porównaniu do CML i SAA [60]. Podsumowując należy stwierdzić, że u pacjentów z ostrymi białaczkami występowanie stanu całkowitego chimeryzmu nie jest gwarantem remisji, podobnie jak wystąpienie mieszanego chimeryzmu nie musi oznaczać nawrotu choroby. Monitorowanie chimeryzmu u pacjentów z ostrymi białaczkami ma swoją zaletę. W białaczkach, w których nie stwierdza się charakterystycznego transkryptu badanie kinetyki chimeryzmu przy pomocy metody STR-PCR stanowi alternatywny sposób monitorowania choroby resztkowej, gdyż może ona być stosowana u wszystkich pacjentów niezależnie od układu płci w parze biorca / dawca [52, 57, 81].

W niniejszej pracy w 1 przypadku (GM nr 30) zaobserwowano spontaniczny powrót do hematopoezy biorcy bez towarzyszącego mu nawrotu choroby podstawowej AML-M4. Całkowitą utratę przeszczepu stwierdzono około 1,5 roku po transplantacji, a wykonane wówczas przy pomocy metody cytometrii przepływowej badanie wykazało, że obserwowana hematopoeza ma prawidłowy charakter (udział mieloblastów o fenotypie CD33+/117+34-0,5%). Można przypuszczać, że w omawianym przypadku zastosowana chemioterapia kondycjonująca połączona z wykonaniem allogenicznego przeszczepienia zadziałała jako

---

wysokodozowana chemioterapia umożliwia eradykację klonu nowotworowego. Współistniejący efekt GvL pozwolił równocześnie na selektywne przeżycie zdrowych autologicznych komórek macierzystych, które w następstwie odtworzyły hematopoezę biorcy. Przykład ten doskonale obrazuje niemożność zrównania pojęcia choroby resztkowej i progresywnego mieszanego chimeryzmu.

Choi i wsp. [36] oraz Rimini i wsp. [80] podkreślają, że pewna część pacjentów poddana allogeniczej transplantacji powraca spontanicznie do własnej hematopoezy. Autologiczna rekonstrukcja jest markerem tolerancji immunologicznej, jak również dużej zgodności tkankowej między biorcą i dawcą względem tkanek prawidłowych (czego wyrazem jest mała częstotliwość występowania GvHD) i nowotworowo zmienionych (osłabiona reakcja GvL). Utajone odrzucenie przeszczepu może wystąpić nawet u pacjentów, którzy na pewnym etapie potransplantacyjnym wykazywali całkowity chimeryzm dawcy [13]. Wytłumaczeniem może być też obecność w materiale przeszczepowym cytotoksycznych limfocytów T skierowanych wyłącznie przeciwko mniejszym antygenom zgodności tkankowej obecnym na komórkach klonu białaczkowego. Takie limfocyty nie niszczą populacji zdrowych resztkowych komórek dawcy, co stwarza szansę dla rozwoju MC bez nawrotu choroby podstawowej [48].

Należy podkreślić, że badanie poziomu chimeryzmu hematopoezy prowadzone szpiku kostnym lub we krwi obwodowej nie odzwierciedla ani nie poprzedza nawrotu pojawiającego się w przestrzeniach pozaszpikowych. Co doskonale obrazuje w niniejszej pracy przykład pacjenta ZW (nr 39).

Alternatywnym sposobem jest ocena chimeryzmu hemopoezy w subpopulacjach komórkowych, na przykład CD34+ lub zawierających klon białaczkowy [107]. W przypadku ostrej białaczki szpikowej we wszystkich podtypach użytecznym markerem wydają się być molekuly CD33 i CD13 [81]. Czułość takiego badania pozwala na rzeczywistą możliwość prowadzenia oceny choroby resztkowej [52], co udowodniono dla komórek CD34+ [31] i dla limfocytów B w przypadku B-CLL i B-ALL [107]. Czułość metody jest porównywalna z oceną obecności genów fuzyjnych lub rearanżacji IgH/TCR [52, 78].

Niezależnie od innych czynników aby rozważyć korelację między poziomem chimeryzmu a chorobą resztkową należy wziąć pod uwagę czy materiał przeszczepowy był poddawany deplecji limfocytów T [108].

#### **5.8.2.4 Częstotliwość monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego**

---

Jednym z poruszanych w literaturze problemów jest brak jednoznacznie ustalonych kryteriów dotyczących częstotliwości monitorowania chimeryzmu, która w sposób znaczący może wpływać na kliniczne znaczenie uzyskiwanych wyników.

W niniejszej rozprawie doktorskiej badania chimeryzmu wykonywano, licząc od 30 doby po transplantacji, w odstępach miesięcznych przez 6 miesięcy, następnie do roku co 3 miesiące a potem co pół roku. Była to oczywiście założona teoretycznie częstotliwość badań natomiast w przypadku istotnych wskazań klinicznych intensyfikowano wykonywanie oznaczeń. Zdaniem autorki niniejszej pracy jest to wystarczająca częstotliwość badań dla uchwycenia momentu załamania całkowitego chimeryzmu.

Zastosowana częstotliwość badań była zgodna z zaleceniami przedstawionymi w literaturze [13, 78].

Antin i wsp. [35] twierdzą, że w przypadku przeprowadzenia allogeniczej transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem mieloablacyjnym wykonywanie badań oceniających poziom chimeryzmu hemopoezy nie jest konieczne. Jeżeli są wykonywane takie badania to odstęp 1, 3, 6 i 12 miesięcy jest wystarczający. Z identyczną częstotliwością należy wykonywać badania również u pacjentów poddanych allogeniczej transplantacji poprzedzonej deplecją limfocytów T, kondycjonowaniem niemieloablacyjnym lub o obniżonej toksyczności jak i w przypadku stosowania eksperymentalnej terapii w profilaktyce GvHD i u pacjentów z SAA. Dodatkowe badania mogą być podyktowane sytuacją kliniczną, np. w przypadku DLI.

Choi i wsp. [36] sugerują, że oznaczenia chimeryzmu powinny być wykonywane częściej niż w odstępach miesięcznych, gdyż brak korelacji między wynikiem chimeryzmu hematopoezy a wystąpieniem określonych zjawisk klinicznych (np. nawrót choroby zwłaszcza w przypadku ostrych białaczek) wynika z długich przerw między badaniami, w których utracono punkt krytyczny, w którym doszło do pojawienia się progresywnego mieszanego chimeryzmu [55, 68, 105]. W przeanalizowanych w niniejszej pracy przypadkach nie wykazano utraty kluczowej informacji ze względu na zbyt rzadkie badania. Przy ustalaniu częstotliwości badań należy również wziąć pod uwagę, że tak częste (w odstępach tygodniowych poczynając od 8 do 100 doby) jak w pracy autorstwa Formankovej i wsp.[109] monitorowanie chimeryzmu jest obciążające dla pacjenta i umożliwia śledzenie zmian chimeryzmu we krwi obwodowej a nie w szpiku kostnym.

Autorce nie wydaje się słusznym zaprzestanie monitorowania chimeryzmu po upływie roku od transplantacji. Po upływie takiego czasu możliwe jest pojawienie się nawrotu choroby podstawowej czy też spontaniczna konwersja do autologicznej hematopoezy [13]. Oczywiście jeżeli tylko pozwala na to stan kliniczny pacjenta, można zmniejszyć częstotliwość



---

monitorowania chimeryzmu ale nie powinno się zaprzestać wykonywania badań. W przypadku występowania niepokojących objawów nawet po upływie 2 lat od transplantacji należy zintensyfikować wykonywanie oznaczeń chimeryzmu hematopoety. Należy również podkreślić, że czas 2 lat po transplantacji przyjęto w niniejszej rozprawie jako graniczny tylko dla celów zakreślenia ram czasowych omawianego badania. W praktyce badania chimeryzmu hematopoety są wykonywane u części pacjentów także w późniejszym okresie. Wydaje się również, że w badaniu chimeryzmu hematopoetycznego oprócz częstotliwości ważne jest systematyczne monitorowanie kinetyki procesu [94].

#### **5.8.2.5 Obraz chimeryzmu hematopoety w czasie występowania GvHD i GvL**

Przeprowadzenie z sukcesem allogeniczej transplantacji wymaga pokonania dwóch immunologicznych barier. Pierwsza z nich to reakcja komórek gospodarza przeciwko przeszczepowi (HvG), która prowadzi do odrzucenia przeszczepu, a druga to przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD [4]. Kontrola efektu HvG ma miejsce przed transplantacją i polega na podaniu chemioterapii kondycjonującej mającej na celu eradykację klonu białaczkowego i układu immunologicznego gospodarza. Kontrola choroby GvH po wykonaniu transplantacji polega na podawaniu immunosupresji [21, 26]. GvHD występuje u około 30 – 70% pacjentów poddanych alloSCT, a w około 20 – 70% przypadków kończy się śmiercią [13, 48, 58].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że u 71,4% (15/21) pacjentów poddanych alloHSCT wystąpiła choroba GvH. W grupie pacjentów, u których wykonano alloNMSCT odsetek osób z tą chorobą wyniósł 54,5% (12/22). W 6 przypadkach w wyniku przewlekłej formy GvHD i w 1 przypadku ostrej postaci GvHD doszło do zgonu pacjenta. Jest to porównywalne do obserwacji przeprowadzonych w innych ośrodkach [13, 48, 58]. Analizy porównawcze przeprowadzono z uwzględnieniem podziału na rodzaj wykonanej transplantacji, rodzaj materiału, w którym wykonywano oznaczenie poziomu chimeryzmu oraz zastosowaną metodę. Wyniki wskazują na wyższy poziom chimeryzmu dawcy w szpiku w grupie pacjentów ze stwierdzoną ostrą postacią GvHD przy czym tylko w przypadku metody RQ-PCR jest to różnica istotna statystycznie. Tendencja ta jest zgodna z badaniami prowadzonymi w innych ośrodkach [13, 26, 34].

W badanej grupie wykazano także, że u 4 pacjentów poddanych alloNMSCT i u 4 poddanych alloHSCT pomimo wystąpienia mieszanego chimeryzmu w niesortowanej populacji komórek doszło do wykształcenia aGvHD, co dowodzi, tego, że mieszany chimeryzm nie

---

wyklucza wystąpienia aGvHD. Rozbieżności z innymi danymi [13, 26, 34, 36, 55] można tłumaczyć różnicą czułości metod oceny chimeryzmu zastosowanymi w niniejszej pracy i powyższych pracach oraz możliwością wystąpienia całkowitego chimeryzmu w linii komórek T [36, 58, 110, 111], co nie zostało poddane ocenie. Z drugiej strony wiadomo, że zastąpienie wszystkich komórek hematopoetycznych biorcy komórkami dawcy nie jest warunkiem koniecznym do wystąpienia aGvHD [28, 57, 58, 96, 112].

Po przeanalizowaniu badanej w niniejszej pracy grupy pacjentów pod względem występowania aGvHD w zależności od układu płci w obrębie pary dawca / biorca wykazano, że jej częstotliwość choć nieistotna statystycznie jest wyższa w grupie par zgodnych pod względem płci, co odbiega od innych badań [50, 113]. Najbardziej prawdopodobną przyczyną takiego wyniku jest mała liczebność badanej grupy pacjentów.

Efekt przeszczep przeciwko białaczce (GvL) jest najczęściej związany z obecnością GvHD a na jego powstanie ma wpływ obecność limfocytów T CD8<sup>+</sup> w przeszczepie [53, 57, 114] oraz stopień niezgodności w głównym [115, 116] i mniejszym [112, 113] układzie zgodności tkankowej. Aby uniknąć choroby GvH bez utraty efektu GvL muszą być spełnione dwa warunki. Po pierwsze pacjent musi się odbudować po kondycjonowaniu, które stymuluje stan zapalny powodujący, że limfocyty T wędrują do tkanek będących tkankami docelowymi dla GvHD. Ponadto materiał przeszczepowy wyjściowo powinien być wolny od alloreaktywnych limfocytów T [114].

#### **5.8.2.6 Wpływ leczenia immunosupresyjnego na zmiany chimeryzmu hematopoezy**

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono przykład pozytywnego wpływu rezygnacji z leczenia immunosupresyjnego podawanego w postaci CsA, które zaowocowało powrotem do hematopoezy dawcy, na skutek zadziałania efektu GvL po podaniu DLI. W dostępnej literaturze [48, 66, 103, 106, 117] odnaleziono podobne doniesienia świadczące o pozytywnych rezultatach zaprzestania leczenia immunosupresyjnego w postaci rozwoju aGvHD. Mechanizm, dzięki któremu zaprzestanie podawania immunosupresji pozwala na indukcję antybiałaczkowej reakcji skierowanej przeciwko resztkowym klonogennym komórkom CML nie jest dokładnie poznany. CsA redukuje ekspresję znajdujących się na komórkach T receptorów HLA-DR i receptorów dla interleukiny 2 (IL-2R), powoduje przełamanie tolerancji i indukuje komórki efektorowe skierowane specyficznie przeciwko antygenom MHC klasy II znajdującym się na zdrowych i nowotworowych komórkach biorcy. Zaprzestanie podawania CsA może spowodować zwiększenie ilości i aktywności komórek T

---

nadekspresję antygenów powierzchniowych, takich jak MHC, DR i IL-2R. Niektóre z tych mechanizmów mogą wzmacniać reakcję GvL. Zaprzeszanie podawania CsA ma swój skutek w prezentacji antygenów i w wykształceniu efektorowej fazy odpowiedzi immunologicznej leżącej u podłoża reakcji GvL [106].

## 5.9 Podsumowanie

Monitorowanie chimeryzmu hematopoezy przy pomocy czułych metod molekularnych jest szczególnie ważne u pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji poprzedzonej kondycjonowaniem niemieloablacyjnym [118]. Jednakże u wszystkich pacjentów poddanych allogenicznej transplantacji jest zabiegiem koniecznym do określenia czasu wystąpienia wszczepienia molekularnego jak i śledzenia zmian zachodzących w hematopoezie w późnym okresie potransplantacyjnym. Wystąpienie stanu mieszanego chimeryzmu, zwłaszcza ocenionego w szpiku kostnym, może wskazywać na odrzucenie przeszczepu lub istnienie choroby resztkowej, a tym samym predyspozycję do nawrotu choroby. Pojawienie się MC może poprzedzać nawrót choroby nawet o kilka tygodni lub miesięcy dlatego tak istotne jest częste monitorowanie poziomu chimeryzmu hematopoetycznego, zwłaszcza w przypadku schorzeń o dużej dynamice (AML czy też CML w fazie kryzy blastycznej). Wzrastający poziom chimeryzmu biorcy może być traktowany jako wskazówka do modyfikacji stosowanej terapii, na przykład rezygnacji z podawania leczenia immunosupresyjnego lub do podania DLI. Badanie chimeryzmu jest również niezbędne do przewidzenia odpowiedzi na zastosowaną DLI (pancytopenia lub wykształcenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi). Analiza poziomu chimeryzmu hematopoezy jest niezbędnym narzędziem diagnostycznym stosowanym w codziennej praktyce ośrodków wykonujących allogeniczne przeszczepienia.

---

## **Rozdział 6**

### **WNIOSKI**

1. Wybrany panel sekwencji STR jest przydatny do monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego u chorych na nowotworowe i nienowotworowe schorzenia układu krwiotwórczego poddanych allogeniczej transplantacji komórek hematopoetycznych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie
2. Wybrany panel sekwencji o biallelicznym polimorfizmie jest przydatny do monitorowania chimeryzmu hematopoetycznego u chorych na nowotworowe i nienowotworowe schorzenia układu krwiotwórczego poddanych allogeniczej transplantacji komórek hematopoetycznych w Katedrze i Klinice Hematologii CMUJ w Krakowie
3. Dostosowano i wdrożono do oceny chimeryzmu hematopoezy test półilościowy STR-PCR
4. Dostosowano i wdrożono do oceny chimeryzmu hematopoezy test ilościowy RQ-PCR

5. Obie analizowane metody molekularne mogą być zastosowane do oceny chimeryzmu hematopoetycznego. Ze względu na pracochłonność i kryteria ekonomiczne polecana jest metoda STR-PCR.
6. Wyniki monitorowania chimeryzmu prowadzone przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR wykazały zgodność z wybranymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi. Wyniki badania chimeryzmu hematopoetycznego charakteryzuje większa wiarygodność, gdy są prowadzone w szpiku kostnym.
7. Wszczepienie molekularne określone jako dominacja alleli dawcy poprzedza wszczepienie hematologiczne. Jego wystąpienie warunkuje odbudowę hematologiczną komórkami pochodzącymi od dawcy.
8. Zastosowana w pracy częstotliwość badań chimeryzmu okazała się wystarczająca i nie doprowadziła do utraty istotnych informacji o przebiegu wszczepienia czy też kinetyce chimeryzmu w późnym okresie potransplantacyjnym. Dla ustalenia czasu wszczepienia molekularnego monitorowanie chimeryzmu hematopoetycznego można rozpocząć we krwi obwodowej już w 2 dobie po transplantacji. Badania chimeryzmu powinny być wykonywane dłużej niż rok po transplantacji.

## ANEKS TABELE

**Tabela 3a. Charakterystyka badanej grupy - kondycjonowanie mieloablacyjne**

| Lp | Pacjent | Diagnoza     | Kondycjonowanie | Źródło komórek macierzystych | Ilość MNC / kg masy ciała x10 <sup>8</sup> | Ilość komórek CD34+ / kg masy ciała x10 <sup>6</sup> | Układ płci B/D | Wiek |
|----|---------|--------------|-----------------|------------------------------|--|--|----------------|------|
| 1  | L.S.    | cALL         | Cy + TBI 12 Gy  | PBSC                         | 10,03                                      | 2,65   | K / K          | 19   |
| 2  | Z.J. I° | cALL         | Cy + TBI        | PBSC                         | 9,38                                       | 8,3  | M / M          | 32   |
| 3  | M.B.    | cALL Ph+     | BuCy 2          | PBSC                         | 8,74                                       | 3,61   | M / K          | 35   |
| 4  | G.K. I° | Pre B ALL HR | Cy + TBI        | BM                           | 5,24                                       | 2,5  | M / K          | 19   |
| 5  | G.S.    | AML          | BuCy            | BM                           | 5,49                                       | 4,7  | K / M          | 38   |
| 6  | A.P.    | AML-M1       | BuCy            | PBSC                         | 8,44                                       | 3,8  | K / M          | 32   |
| 7  | T.G.    | AML-M1       | Bu Cy           | BM                           | 1,13                                       | 1,07   | M / K          | 43   |
| 8  | K.Sz.   | AML M1 HR    | BuCy            | PBSC                         | 8,8  | 2,8  | M / K          | 42   |
| 9  | K.M.    | AML M1/2     | BuCy 2          | BM                           | 5,7  | 4,5  | K / M          | 38   |
| 10 | M.K.    | AML-M3       | Bu Cy           | BM                           | 1,15                                       | 0,85   | M / K          | 28   |

|    |         |          |       |      |      |      |       |    |
|----|---------|----------|-------|------|------|------|-------|----|
| 11 | B.P.    | AML-M4   | Bu Cy | BM   | 3,86 | 2,8  | M / M | 43 |
| 12 | R.B.    | AML – M4 | Bu Cy | BM   | 3,84 | 2,45 | M / M | 36 |
| 13 | G.K. I° | AML - M4 | Bu Cy | PBSC | 8,91 | 5,1  | M / M | 25 |
| 14 | S.Ś.    | AML-M4   | Bu Cy | BM   | 4,16 | 2,37 | M / K | 39 |
| 15 | A.H. I° | AML-M4   | Bu Cy | BM   | 9,18 | 4,19 | K / M | 20 |
| 16 | D.L.    | CML      | BuCy  | BM   | 3,7  | 2,3  | K / K | 35 |
| 17 | J.N.    | CML      | BuCy  | BM   | 4,44 | 1,58 | M / K | 40 |
| 18 | A. W.   | CML      | BuCy  | BM   | 7,26 | 5,88 | K / M | 25 |
| 19 | M.B.    | SAA      | BuCy  | BM   | 6,53 | 2,72 | K / M | 17 |
| 20 | M.M.    | SAA      | BuCy  | PBSC | 7,95 | 4,37 | M / M | 19 |
| 21 | M. N.   | OMF      | BuCy  | BM   | 4,69 | 2,95 | K / K | 23 |

ALL- ostra białaczka limfoblastyczna, AML – ostra białaczka szpikowa, CML – przewlekła białaczka szpikowa, CLL – przewlekła białaczka limfatyczna, SAA – ciężka anemia aplastyczna, IDCC. – dendritic sarkoma, OMF – mielofibroza Bu – busulfan, Cy – cyklofosfamid, TBI – napromieniowanie całego ciała, BM – szpik kostny, PBSC – krew obwodowa, K – kobieta, M – mężczyzna HR – wysokie ryzyko, B – biorca, D – dawca.

**Tabela 3b. Charakterystyka badanej grupy - kondycjonowanie niemieloablacyjne**

| Lp. | Pacjent  | Diagnoza    | Kondycjonowanie       | Źródło komórek macierzystych | Ilość MNC / kg masy ciała x10 <sup>8</sup> | Ilość komórek CD34+ /kg masy ciała x10 <sup>6</sup> | Układ płci B/D | Wiek |
|-----|----------|-------------|-----------------------|------------------------------|--|---|----------------|------|
| 22  | A.G.     | cALL        | FLAG-Ida              | BM                           | 4,99                                       | 4,21  | K / M          | 17   |
| 23  | B.W.     | cALL        | FLAG-Ida              | BM + PBSC                    | 9,27                                       | 5,79  | K / M          | 46   |
| 24  | Z.J.II°  | cALL        | FLAG Ida              | PBSC                         | 8  | 3,4   | M / M          | 32   |
| 25  | G.K.II°  | PreB ALL HR | FLAG-Ida              | PBSC                         | 8,86                                       | 5,4   | M / K          | 19   |
| 26  | W.S      | AML M2      | FLAG-Ida              | PBSC                         | 8,71                                       | 4,58  | K / K          | 47   |
| 27  | W.S.     | AML M2      | FLAG-Ida              | BM + PBSC                    | 5,67                                       | 2,2   | K / K          | 42   |
| 28  | A.J.     | AML M2      | FLAG-Ida              | PBSC                         | 8,47                                       | 4,26  | K / M          | 39   |
| 29  | S.T.     | AML M3      | Treosulfan + Fosfamid | PBSC                         | 7,64                                       | 5,35  | K / K          | 20   |
| 30  | G.M.     | AML M4      | FLAG-Ida              | BM + PBSC                    | 6,75                                       | 8,58  | K / M          | 44   |
| 31  | G.K.II°  | AML M4      | FLAG-Ida              | PBSC                         | 5,22                                       | 3,52  | M / M          | 26   |
| 32  | A.H. II° | AML M4      | Cytarabina            | PBSC/DLI                     | 6,31                                       | 4,42  | K / M          | 20   |
| 33  | L.J.     | AML M5      | FLAG Ida              | PBSC                         | 8,13                                       | 6,7   | K / K          | 35   |
| 34  | J.Sz.    | CML         | Bu + FLU + ATG        | BM + PBSC                    | 4,98                                       | 3,86  | M / M          | 36   |
| 35  | W. Ż.    | CML         | FLU + ATG +Bu         | PBSC                         | 4,32                                       | 4,10  | M / M          | 44   |

|    |          |       |                        |          |       |      |       |    |
|----|----------|-------|------------------------|----------|-------|------|-------|----|
| 36 | W.N.     | B-CLL | CTX + FLU              | BM       | 10,1  | 4,87 | K / K | 47 |
| 37 | A.N I°   | B-CLL | CTX + FLU              | PBSC     | 13,01 | 2,87 | K / M | 56 |
| 38 | A.N. II° | B-CLL | FLU + Cy +<br>Mabthera | PBSC     | 16,44 | 2,07 | K / M | 58 |
| 39 | Z.W.     | MM    | 200 TBI + FLU          | PBSC     | 12,16 | 3,5  | M / M | 55 |
| 40 | A.S.     | IDDCS | TREOSULFAN<br>+ FLU    | BM +PBSC | 1,81  | 1,38 | K / M | 45 |
| 41 | K.G.     | SAA   | CTX + ATG              | BM       | 4,1   | 3,4  | K / K | 26 |
| 42 | P.G.     | SAA   | Cy                     | BM       | 5,95  | 3,15 | M / M | 18 |
| 43 | U.K.     | SAA   | CTX                    | BM       | 4,29  | 1,59 | K / K | 32 |

ALL- ostra białaczka limfoblastyczna, AML – ostra białaczka szpikowa, CML – przewlekła białaczka szpikowa, CLL – przewlekła białaczka limfatyczna, SAA – ciężka anemia aplastyczna, MM –szpiczak mnogi, IDCC. – dendritic sarkoma, OMF – mielofibroza Bu – busulfan, Cy – cyklofosfamid, FLAG Ida – fludarabina, globulina antytymocytarna, idarubicyna, FLU- fludarabina, ATG – globulina antytymocytarna, CTX - BM – szpik kostny, PBSC – krew obwodowa, K – kobieta, M – mężczyzna HR – wysokie ryzyko, B – biorca, D – dawca

**Tabela 4. Charakterystyka sekwencji STR**

| Lp | Numer chromosomu | Locus chromosomowe | Ilość alleli | Struktura powtórzeń | Powtarzana sekwencja |
|----|------------------|--------------------|--------------|---------------------|----------------------|
| 1  | 3                | D3S3045            | 7            | TeTN                | AGAT                 |
| 2  | 4                | D4S2366            | 7            | TeTN                | GATA                 |
| 3  | 12               | D12S1064           | 8            | TeTN                | CTAT                 |
| 4  | 16               | D16S539            | 12           | TeTN                | ACAG                 |
| 5  | 17               | D17S1290           | 9            | TeTN                | AGAT                 |
| 6  | 20               | D20S481            | 8            | TeTN                | TCTA                 |
| 7  | 22               | D22S689            | 7            | TeTN                | TATG                 |

TetN – czteronukleotydomowa sekwencja powtarzana

**Tabela 5. Charakterystyka starterów zastosowanych w reakcji STR-PCR**

| Lp. | Locus chromosomowe | Nazwa startera | Sekwencja startera 5' do 3'         |
|-----|--------------------|----------------|-------------------------------------|
| 1   | D3S045             | GATA84B12F     | Cy 5,0 – ACC AAA TGA GAC AGT GGC AT |
|     |                    | GATA84B12R     | ATG AGG ACG GTT GAC ATC TG          |
| 2   | D4S2366            | GATA22G05F     | Cy 5,0 – TCC TGA CAT TCC TAG GGT GA |
|     |                    | GATA22G05R     | AAA ACA AAT ATG GCT CTA TCT ATC G   |
| 3   | D12S1064           | GATA63D12F     | Cy 5,0 – ACT ACT CCA AGG TTC CAG CC |
|     |                    | GATA63D12R     | AAT ATT GAC TTT CTC TTG CTA CCC     |
| 4   | D16S539            | GATA11C06F     | Cy 5,0 – GAT CCC AAG CTC TTC CTC TT |
|     |                    | GATA11C06R     | ACG TTT GTG TGT GCA TCT GT          |
| 5   | D17S1290           | GATA49C09F     | Cy 5,0 – GCC AAC AGA GCA AGA CTG TC |
|     |                    | GATA49C09R     | CGA AAC AGT TAA ATG GCC AA          |

|   |         |            |   |
|---|---------|------------|---|
| 6 | D20S481 | GATA47F05F | Cy 5,0 – TGG GTT ATG AGT GCA CAC AG       |
|   |         | GATA47F05R | AAC AGC AAA AAG ACA CAC AGC               |
| 7 | D22S689 | GATA21F03F | Cy 5,0 – TAT GTA CAG ACC TGC AAC TTG<br>C |
|   |         | GATA21F03R | CCT GCC TGC CTA TCT ATC TG                |

**Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę AmpliTaq GOLD**

| Składniki mieszaniny reakcyjnej          | Objętość na reakcję         | Stężenie w mieszaninie |
|--|-----------------------------|------------------------|
| PCR Bufor GOLD 10x bez MgCl <sub>2</sub> | 2,5 µl                      | 1x                     |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                  | 1,2 µl                      | 0,6 mM                 |
| 2,5 mM mieszanina dNTP (2,5 mM każdy)    | 2,0 µl                      | 200 µM                 |
| Starter z barwnikiem Cy 5.0 2,5 µM       | 1,0 µl                      | 0,1 µM                 |
| Starter nieznakowany 10 µM               | 1,0 µl                      | 0,4 µM                 |
| Polimeraza AmpliTaq GOLD                 | 0,125 µl                    | 0,625 U / reakcję      |
| H <sub>2</sub> O                         | Do końcowej objętości 20 µl | –                      |

**Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę Fast Start Taq DNA**

| Składniki mieszaniny reakcyjnej                  | Objętość na reakcję         | Stężenie w mieszaninie     |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| Bufor PCR 10x zawierający 20mM MgCl <sub>2</sub> | 2,5 µl                      | 1x (MgCl <sub>2</sub> 2mM) |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                          | 1,0 µl                      | 2,5 mM                     |
| 2,5 mM mieszanina dNTP (2,5 mM każdy)            | 2,0 µl                      | 200 µM                     |
| Starter forward (F) 10 µM                        | 1 µl                        | 0,4 µM                     |
| Starter reverse (R) 10 µM                        | 1 µl                        | 0,4 µM                     |
| Polimeraza Fast Start Taq DNA                    | 0,2 µl                      | 1,0 U / reakcję            |
| GC RICH 5 x                                      | 5 µl                        | 1 x                        |
| H <sub>2</sub> O                                 | Do końcowej objętości 20 µl | –                          |

**Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej barwnik SYBR green**

| Składniki mieszaniny reakcyjnej | Objętość na reakcję | Stężenie w mieszaninie |
|---------------------------------|---------------------|------------------------|
|---------------------------------|---------------------|------------------------|



|  |                             |        |
|--|-----------------------------|--------|
| 2x Master Mix QuantiTect SYBR green zawierający: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bufor do PCR QuantiTect SYBR Green</li> <li>▪ 5 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>▪ Mieszanina dNTP</li> <li>▪ SYBR Green I</li> <li>▪ ROX (kontrola wewnętrzna)</li> <li>▪ Polimeraza DNA HotStartTaq</li> </ul> | 11 µl                       | 1x     |
| Starter forward (F) 10 µM  | 1 µl                        | 0,4 µM |
| Sarter reverse (R) 10 µM   | 1 µl                        | 0,4 µM |
| H <sub>2</sub> O   | Do końcowej objętości 20 µl | –      |

**Tabela 9. Charakterystyka starterów używanych w reakcji RQ-PCR**

| Lp | Lokalizacja na chromosomie | Nazwa startera | Sekwencja startera w kierunku 5' - 3' |
|----|----------------------------|----------------|---------------------------------------|
| 1  | 17q                        | S01aF          | GGT ACC GGG TCT CCA CAT GA            |
|    |                            | S01aR          | GGG AAA GTC ACT CAC CCA AGG           |
|    |                            | S01bF          | GTA CCG GGT CTC CAC CAG G             |
| 2  | Y                          | S02 F          | GCT TCT CTG GTT GGA GTC ACG           |
|    |                            | S02 R          | GCT TGC TGG CGG ACC CT                |
| 3  | 6 q                        | S03 F          | CTT TTG CTT TCT GTT TCT TAA GGG C     |
|    |                            | S03 R          | TCA ATC TTT GGG CAG GTT GAA           |
| 4  | 9                          | S04a F         | CTG GTG CCC ACA GTT ACG CT            |
|    |                            | S04a R         | AAG GAT GCG TGA CTG CTA TGG           |
|    |                            | S04b R         | AGG ATG CGT GAC TGC TCC TC            |
| 5  | 20                         | S05a F         | AAA GTA GAC ACG GCC AGA CTT AGG       |
|    |                            | S05a R         | CAT CCC CAC ATA CGG AAA AGA           |
|    |                            | S05b F         | AGT TAA AGT AGA CAC GGC CTC CC        |
| 6  | 1 p                        | S06 F          | CAG TCA CCC CGT GAA GTC CT            |
|    |                            | S06 R          | TTT CCC CCA TCT GCC TAT TG            |
| 7  | X                          | S07a F         | TGG TAT TGG CTT TAA AAT ACT GGG       |
|    |                            | S07a R         | TGT ACC CAA AAC TCA GCT GCA           |
|    |                            | S07b F         | GGT ATT GGC TTT AAA ATA CTC AAC C     |
|    |                            | S07b R         | CAG CTG CAA CAG TTA TCA ACG TT        |
| 8  | 1q                         | S08a F         | CTG GAT GCC TCA CTG ATC CA            |
|    |                            | S08a R         | TGG GAA GGA TGC ATA TGA TCT G         |
|    |                            | S08b F         | GCT GGA TGC CTC ACT GAT GTT           |
| 9  | 17 q                       | S09a F         | GGG CAC CCG TGT GAG TTT T             |
|    |                            | S09a R         | TCA GCT TGT CTG CTT TCT GGA A         |
|    |                            | S09b R         | CAG CTT GTC TGC TTT CTG CTG           |
| 10 | 18                         | S10a F         | GCC ACA AGA GAC TCA G                 |
|    |                            | S10a R         | TGG CTT CCT TGA GGT GGA AT            |
|    |                            | S10b F         | TTA GAG CCA CAA GAG ACA ACC AG        |
| 11 | 11                         | S11a F         | TAG GAT TCA ACC CTG GAA GC            |
|    |                            | S11a R         | CCA GCA TGC ACC TGA CTA ACA           |
|    |                            | S11b F         | CCC TGG ATC GCC GTG AA                |

|    |                |                            |
|----|----------------|----------------------------|
| 12 | <b>GAPDH F</b> | GGA CTG AGG CTC CCA CCT TT |
|    | <b>GAPDH R</b> | GCA TGG ACT GTG GTC TGC AA |

**Tabela 10. Informatywne sekwencje STR o wysokim stopniu polimorfizmu**

| Nr alloSCT | Inicjaly pacjenta | Nazwa starterów  | Locus STR          |
|------------|-------------------|------------------|--------------------|
| 1          | L.S               | GATA 22; GATA 63 | D4S2366, D12S1064  |
| 2, 24*     | Z.J.              | GATA 22; GATA 84 | D4S2366, D3S045    |
| 3          | M.B.              | GATA 49; GATA 63 | D17S1290, D12S1064 |
| 4, 25*     | G.K.              | GATA 22; GATA 84 | D4S2366, D3S045    |
| 5          | G.S.              | GATA 11; GATA 49 | D16S539, D17S1290  |
| 6          | A.P.              | GATA 11; GATA 84 | D16S539, D3S045    |
| 7          | T.G.              | GATA 22; GATA 47 | D4S2366, D20S481   |
| 8          | K.Sz.             | GATA 21; GATA 63 | D22S689, D12S1064  |
| 9          | K.M.              | GATA 47; GATA 49 | D20S481, D17S1290  |
| 10         | M.K.              | GATA 49; GATA 63 | D17S1290, D12S1064 |
| 11         | B.P.              | GATA 21; GATA 84 | D22S689, D3S045    |
| 12         | R.B.              | GATA 11; GATA 63 | D16S539, D12S1064  |
| 13, 31*    | G.K.              | GATA 47; GATA 63 | D20S481, D12S1064  |
| 14         | S.Ś.              | GATA 22; GATA 49 | D4S2366, D17S1290  |
| 15, 32*    | A.H.              | GATA 21; GATA 49 | D22S689, D17S1290  |
| 16         | D.L.              | GATA 21; GATA 47 | D22S689, D20S481   |
| 17         | J.N.              | GATA 49; GATA 84 | D17S1290, D3S045   |
| 18         | A.W.              | GATA 11; GATA 22 | D16S539, D4S2366   |
| 19         | M.B.              | GATA 21; GATA 22 | D22S689, D4S2366   |
| 20         | M.M.              | GATA 11; GATA 63 | D16S539, D12S1064  |
| 21         | M.N.              | GATA 11; GATA 21 | D16S539, D22S689   |
| 22         | A.G.              | GATA 22; GATA 84 | D4S2366, D3S045    |
| 23         | B.W.              | GATA 21; GATA 47 | D22S689, D20S481   |
| 26         | W.S.              | GATA 11; GATA 47 | D16S539, D20S481   |
| 27         | W.S.              | GATA 22; GATA 49 | D4S2366, D17S1290  |
| 28         | A.J.              | GATA 22; GATA 47 | D4S2366, D20S481   |
| 29         | S.T.              | GATA 11; GATA 63 | D16S539, D12S1064  |
| 30         | G.M.              | GATA 63          | D12S1064           |
| 33         | L.J.              | GATA 21; GATA 47 | D22S689, D20S481   |
| 34         | J.Sz.             | GATA 47; GATA 84 | D20S481, D3S045    |

|         |      |                  |                    |
|---------|------|------------------|--------------------|
| 35      | W.Ż  | GATA 21; GATA 22 | D22S689, D4S2366   |
| 36      | W.N. | GATA 22 GATA 49  | D4S2366, D17S1290  |
| 37, 38* | A.N. | GATA 47; GATA 84 | D20S481, D3S045    |
| 39      | Z.W. | GATA 22; GATA 47 | D4S2366, D20S481   |
| 40      | A.S. | GATA 47; GATA 84 | D20S481, D3S045    |
| 41      | K.G. | GATA 49; GATA 63 | D17S1290, D12S1064 |
| 42      | P.G. | GATA 11; GATA 21 | D16S539, D22S689   |
| 43      | U.K. | GATA 47; GATA 84 | D20S481, D3S045    |

\* u danego pacjenta przeprowadzono dwie alloSCT;

**Tabela 11. Częstość występowania informatywnych loci STR (metoda STR-PCR)**

| Lp. | Starter | Locus STR | Ilość alleli | Częstość występowania* | Częstość występowania różnic** |
|-----|---------|-----------|--------------|------------------------|--------------------------------|
| 1   | GATA 84 | D3S045    | 7            | 10/38 (13,3%)          | 22/266 (8,3%)                  |
| 2   | GATA 22 | D4S2366   | 7            | 13/38 (17,4%)          | 25/266 (9,4%)                  |
| 3   | GATA 21 | D22S689   | 7            | 10/38 (13,3%)          | 22/266 (8,3%)                  |
| 4   | GATA 47 | D20S481   | 8            | 13/38 (17,4%)          | 26/266 (9,8%)                  |
| 5   | GATA 63 | D12S1064  | 8            | 10/38 (13,3%)          | 20/266 (7,5%)                  |
| 6   | GATA 49 | D17S1290  | 9            | 10/38 (13,3%)          | 17/266 (6,4%)                  |
| 7   | GATA 11 | D16S539   | 12           | 9/38 (12%)             | 20/266 (7,5%)                  |

\* częstość występowania sekwencji informatywnych w przeliczeniu na 38 par biorców / dawców

\*\* częstość występowania układów, w których stwierdzono różnice wyrażono w przeliczeniu na 266 przeanalizowanych układów w parach biorców / dawców

**Tabela 12. Informatywne sekwencje o dwuallelicznym polimorfizmie**

| Nr alloHSCT | Inicjały pacjenta | Biorca/<br>Dawca | Startery | Lokalizacja sekwencji na chromosomie |
|-------------|-------------------|------------------|----------|--------------------------------------|
| 1           | L.S.              | B                | S04aFbR  | 9                                    |
|             |                   | D                | S08aFaR  | 1q                                   |
| 2, 24*      | Z.J.              | B                | S07bFbR  | X                                    |
|             |                   | D                | S07aFaR  | X                                    |
| 3           | M.B.              | B                | S02FR    | Y                                    |
|             |                   | D                | S10aFaR  | 18                                   |
| 4, 25*      | G.K.              | B                | S04aFaR  | 9                                    |
|             |                   | D                | S01aFaR  | 17q                                  |
| 5           | G.S.              | B                | S08aFaR  | 1q                                   |
|             |                   | D                | S02FR    | Y                                    |
| 6           | A.P.              | B                | NW       | NW                                   |
|             |                   | D                | S08aFaR  | 1q                                   |

|                       |              |          |                |          |
|-----------------------|--------------|----------|----------------|----------|
| 7                     | T.G.         | B        | S07aFbR        | X        |
|                       |              | D        | S07bFbR        | X        |
| 8                     | K.Sz.        | B        | S01bFaR        | 17q      |
|                       |              | D        | S01aFaR        | 17q      |
| 9                     | K.M.         | B        | S07bFaR        | X        |
|                       |              | D        | S05bFaR        | 20       |
| 10                    | M.K.         | B        | S02FR          | Y        |
|                       |              | D        | S04aFaR        | 9        |
| 11                    | B.P.         | B        | S04aFbR        | 9        |
|                       |              | D        | S09aFaR        | 17 q     |
| 12                    | R.B.         | B        | S05bFaR        | 20       |
|                       |              | D        | S11aFaR        | 11       |
| 13, 31*               | G.K.         | B        | NW             | NW       |
|                       |              | D        | S11bFaR        | 11       |
| 14                    | S.Ś.         | B        | S01aFaR        | 17q      |
|                       |              | D        | S03FR          | 6 q      |
| 15, 32*               | A.H.         | B        | S07bFbR        | X        |
|                       |              | D        | S02FR          | Y        |
| 16                    | D.L.         | B        | S10bFaR        | 18       |
|                       |              | D        | S11aFaR        | 11       |
| Ciąg dalszy Tabeli 12 |              |          |                |          |
| 17                    | J.N.         | B        | S05bFaR        | 20       |
|                       |              | D        | S10aFaR        | 18       |
| 18                    | A.W.         | B        | NW             | NW       |
|                       |              | D        | S02FR          | Y        |
| 19                    | M.B.         | B        | S07aFaR        | X        |
|                       |              | D        | S10bFaR        | 18       |
| 20                    | M.M.         | B        | S05bFaR        | 20       |
|                       |              | D        | S06FR          | 1 p      |
| 21                    | M.N.         | B        | S01aFaR        | 17q      |
|                       |              | D        | NW             | NW       |
| 22                    | A.G.         | B        | S07aFaR        | X        |
|                       |              | D        | S02FR          | Y        |
| 23                    | B.W.         | B        | NW             | NW       |
|                       |              | D        | S10bFaR,       | 18       |
| 26                    | W.S.         | B        | S01aFaR        | 17q      |
|                       |              | D        | S07aFaR        | X        |
| 27                    | W.S.         | B        | S06FR          | 1 p      |
|                       |              | D        | NW             | NW       |
| 28                    | A.J.         | B        | S01bFaR        | 17q      |
|                       |              | D        | S10aFaR        | 18       |
| 29                    | S.T.         | B        | S11aFaR        | 11       |
|                       |              | D        | S04aFbR        | 9        |
| 30                    | G.M.         | B        | S10aFaR        | 18       |
|                       |              | D        | S02FR          | Y        |
| 33                    | L.J.         | B        | S04aFaR        | 9        |
|                       |              | D        | S01bFaR        | 17q      |
| 34<br>DS07bFaRX3<br>5 | J.Sz.<br>W.Ż | B        | S03FR          | 6 q      |
|                       |              | D        | NW             | NW       |
|                       |              | <b>B</b> | <b>S07aFbR</b> | <b>X</b> |
| 36                    | W.N.         | B        | NW             | NW       |
|                       |              | D        | S08aFaR        | 1q       |

|         |      |   |         |     |
|---------|------|---|---------|-----|
| 37, 38* | A.N. | B | S11aFaR | 11  |
|         |      | D | S05bFaR | 20  |
| 39      | Z.W. | B | S11aFaR | 11  |
|         |      | D | S01aFaR | 17q |
| 40      | A.S. | B | S07bFbR | X   |
|         |      | D | S02FR   | Y   |
| 41      | K.G. | B | S01aFaR | 17q |
|         |      | D | NW      | NW  |
| 42      | P.G. | B | S01bFaR | 17q |
|         |      | D | S10bFaR | 18  |
| 43      | U.K. | B | S06FR   | 1 p |
|         |      | D | S08aFaR | 1q  |

\*u danego pacjenta przeprowadzono dwie alloSCT; NW – w oparciu o posiadany panel sekwencji o dwuallelicznym polimorfizmie nie wykryto sekwencji informatywnej

**Tabela 13. Porównanie czułości metody STR-PCR i RQ-PCR**

| Teoretyczny udział hematopoezy dawcy | Metoda STR-PCR | Metoda RQ-PCR |
|--------------------------------------|----------------|---------------|
| 80%                                  | 71,6%          | 91,2%         |
| 50%                                  | 48,3           | 46,4%         |
| 20%                                  | 13,1%          | 20,8%         |
| 5%                                   | 3,3%           | 4,1%          |
| 3%                                   | 3,42%          | 3,97%         |
| 1,25%                                | 0,5%           | 0,97%         |
| 0,125%                               | 0%             | 0,09%         |
| 0,0125%                              | 0%             | 0,017%        |

**Tabela 14a. Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego w grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu mieloablacyjnemu**

| Lp. | Biorca       | Doba po allogeniczej transplantacji |      |      |      |      |      |       |      |      |
|-----|--------------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|------|------|
|     |              | +2                                  | +4   | +6   | +8   | +10  | +12  | +14   | +21  | +28  |
| 1   | L.S.         | 56,9                                | 63,1 | 58,9 | 70,4 | 64,5 | 71,5 | 86,2  | 85,9 | 95,5 |
| 2   | Z.J. I°      | X                                   | 70,1 | 67,1 | 80,0 | 88,8 | 94,7 | 94,1  | 96,5 | 96,9 |
| 3   | M.B.         | 2,2                                 | 6,2  | 48,7 | 45,3 | 52,7 | 92,4 | 95,0  | 89,1 | 91,3 |
| 4   | G.K. I°      | 49,0                                | 78,6 | 76,9 | 54,4 | 63,1 | 65,1 | 68,9  | 75,5 | 99,6 |
| 5   | G.S.         | 11,9                                | 68,8 | 77,9 | 78,1 | 83,3 | 93,9 | 96,2  | 99,1 | 96,6 |
| 6   | A.P.         | 8,3                                 | 13,9 | 46,5 | 61,5 | 58,7 | 81,1 | 86,8  | 96   | 93,2 |
| 7   | T.G.         | X                                   | 5,3  | 45,8 | 78,3 | 84,8 | 64,9 | 72,15 | X    | X    |
| 8   | <b>K.Sz.</b> | 11,6                                | 37,6 | 67,4 | 72,3 | X    | 78,6 | 78,6  | 82,9 | 93,0 |
| 9   | K.M.         | 3,8                                 | 21,9 | 43,4 | X    | 92,9 | 93,3 | 95,5  | 92,3 | 96,6 |
| 10  | M.K.         | 30,3                                | 33,5 | 29,5 | 34,0 | 41,8 | 44,5 | 48,8  | 85,5 | 77,4 |
| 11  | B.P.         | 10,9                                | 71,5 | 82,7 | 69,4 | 88,5 | 83,5 | 84,8  | 100  | 100  |
| 12  | R.B.         | 15,2                                | 58,8 | 59,9 | 46,9 | 61,3 | 75,6 | 83,0  | 86,9 | 100  |

|    |         |      |      |      |       |      |      |      |      |      |
|----|---------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| 13 | G.K. I° | 74,4 | 81,9 | 85,7 | 87,1  | 88,6 | 92,1 | 93,4 | 96,2 | 100  |
| 14 | S.Ś.    | 4,3  | 19,1 | 41,3 | 45,5  | 53,5 | 72,2 | 65,7 | 87,1 | 95,4 |
| 15 | A.H. I° | 38,0 | 61,3 | X    | 83,6  | 90,5 | 91,6 | 93,5 | 96,5 | 99,5 |
| 16 | D.L.    | 0,9  | 4,1  | 22,3 | 52,3  | 85,2 | 75,5 | 86,1 | 91,9 | 88,0 |
| 17 | J.N.    | 0    | 34,9 | 61,9 | 45,17 | 71,6 | 83,3 | 82,9 | 91,5 | 98,2 |
| 18 | A. W.   | 37,2 | 72,7 | 65,2 | 81,9  | 93,5 | 98,2 | 98,5 | 98,2 | 97,2 |
| 19 | M.B.    | 75,1 | 67,1 | 58,3 | 52,9  | 62,5 | 59,7 | 80,2 | 96,9 | 87,3 |
| 20 | M.M.    | 7,2  | X    | 80,8 | 89,5  | 94,2 | 99,7 | 99,2 | 99,7 | 100  |
| 21 | M. N.   | 3,4  | 40,6 | 20,8 | 59,9  | 57,1 | 65,1 | 79,6 | 89,9 | 97,4 |

X- brak danych

**Tabela 14b. Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego w grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu niemieloablacyjnemu**

| Lp. | Biorca   | Doba po allogeniczej transplantacji |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----|----------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|     |          | +2                                  | +4   | +6   | +8   | +10  | +12  | +14  | +21  | +28  |
| 22  | A.G.     | X                                   | X    | X    | 100  | X    | X    | 100  | 100  | 100  |
| 23  | B.W.     | 81,3                                | 62,3 | 43,8 | 89,5 | 86,1 | 74,6 | 65,3 | 100  | 100  |
| 24  | Z.J.II°  | X                                   | X    | X    | X    | X    | X    | X    | 96,5 | 97,5 |
| 25  | G.K.II°  | 98,5                                | 97,9 | 97,7 | 98,2 | 97,3 | 97,9 | 97,5 | 99,1 | 96,6 |
| 26  | W.S      | X                                   | X    | X    | 54,1 | X    | X    | 77,3 | 100  | 100  |
| 27  | W.S.     | 56,5                                | 41,3 | 30,2 | 59,1 | 54,7 | 59,0 | 60,1 | 89,5 | 92,6 |
| 28  | A.J.     | 43,9                                | 81,4 | 77,5 | 83,5 | 91,4 | 86,7 | 94,3 | 94,0 | 95,2 |
| 29  | S.T.     | 75,7                                | 82,7 | X    | 100  | 100  | 100  | 98,1 | 98,8 | 98,7 |
| 30  | G.M.     | X                                   | 31,9 | 80,8 | 73,8 | 61,2 | 72,8 | 66,8 | 86,0 | 100  |
| 31  | G.K.II°  | 89,7                                | 91,4 | 92,3 | 92,1 | 93,0 | 81,3 | 82,8 | 87,0 | 91,5 |
| 32  | A.H. II° | 81,5                                | 79,1 | 93,1 | 92,4 | 95,9 | 90,8 | 90,7 | 91,4 | 95,8 |
| 33  | L.J.     | 38,5                                | 30,4 | 29,2 | 26,6 | 38,1 | 71,0 | 78,5 | 93,8 | 94,3 |
| 34  | J.Sz.    | 11,4                                | 8,5  | 12,3 | 20,9 | 29,0 | 61,8 | 51,9 | 93,7 | 77,9 |
| 35  | W. Ż.    | 11,8                                | 11,3 | 11,3 | 7,8  | 87,5 | 83,1 | 87,2 | 93,3 | 100  |
| 36  | W.N.     | X                                   | X    | X    | X    | X    | X    | X    | 28,5 | 69,0 |
| 37  | A.N I°   | 19,9                                | 20,7 | X    | 19,6 | 23,3 | 22,4 | 22,8 | 44,3 | 46,4 |
| 38  | A.N. II° | 14,5                                | X    | 17,5 | 16,7 | 6,8  | 8,8  | 8,4  | 2,9  | 2,6  |
| 39  | Z.W.     | 16,1                                | 12,0 | 8,5  | 12,5 | 12,9 | 20,9 | 16,8 | 64,8 | 78,8 |
| 40  | A.S.     | 76,2                                | 38,1 | 63,8 | 89,5 | 89,7 | 90,9 | 93,7 | 99,3 | 100  |
| 41  | K.G.     | 100                                 | 100  | 100  | 100  | 98,5 | 95,8 | 92,0 | 87,0 | 76,0 |
| 42  | P.G.     | 19,2                                | 51,9 | 55,5 | 48,8 | 49,3 | 62,0 | 66,5 | 83,9 | 100  |
| 43  | U.K.     | 52,3                                | 89,7 | 77,2 | 74,3 | 81,5 | 84,6 | 92,3 | 97,2 | 100  |

X – brak danych

**Tabela 15a. Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i krwi w 30 dobie po alloHSCT (metody STR-PCR i RQ-PCR)**

| Lp.                              | Biorca  | STR-PCR                    |                             | RQ-PCR                     |                             |
|----------------------------------|---------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                  |         | Krew [% hematopoezy dawcy] | Szpic [% hematopoezy dawcy] | Krew [% hematopoezy dawcy] | Szpic [% hematopoezy dawcy] |
| 1                                | L.S.    | 87,8                       | 86,0                        | 95,8                       | 95,6                        |
| 2                                | Z.J. I° | 96,9                       | X                           | 95,4                       | X                           |
| 3                                | M.B.    | 91,3                       | 92,8                        | 92,7                       | 99,6                        |
| 4                                | G.K. I° | 99,6                       | 95,9                        | 98,9                       | 94,1                        |
| 5                                | G.S.    | 96,6                       | 100                         | 92,7                       | 98,6                        |
| 6                                | A.P.    | 93,2                       | X                           | 95,8                       | X                           |
| 7                                | T.G.    | X                          | X                           | X                          | X                           |
| 8                                | K.Sz.   | 93,0                       | 93,1                        | 98,3                       | 99,2                        |
| 9                                | K.M.    | 96,6                       | 99,3                        | 94,4                       | 96,1                        |
| 10                               | M.K.    | 77,4                       | 87,8                        | 96,2                       | 100                         |
| 11                               | B.P.    | 100                        | X                           | 98,7                       | X                           |
| 12                               | R.B.    | 100                        | 100                         | 100                        | 100                         |
| 13                               | G.K. I° | 100                        | 100                         | *                          | 90,1                        |
| 14                               | S.Ś.    | 95,4                       | 97,4                        | 97,3                       | 96,8                        |
| 15                               | A.H. I° | 99,5                       | 93,6                        | 92,4                       | 91,1                        |
| 16                               | D.L.    | 88,0                       | 99,0                        | 100                        | 100                         |
| 17                               | J.N.    | 98,2                       | 95,3                        | *                          | 95,1                        |
| 18                               | A. W.   | 97,2                       | 97,8                        | 100                        | 100                         |
| 19                               | M.B.    | 87,3                       | 97,8                        | 96,8                       | 100                         |
| 20                               | M.M.    | 100                        | 100                         | 93,6                       | 92,4                        |
| 21                               | M. N.   | 97,4                       | 96,9                        | 99,2                       | 99,6                        |
| <b>Średnia arytmetyczna ± SD</b> |         | <b>94,77 ± 5,9</b>         | <b>96,04 ± 4,2</b>          | <b>96,57 ± 2,6</b>         | <b>96,95 ± 3,4</b>          |

Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna z dwóch sekwencji STR

X – brak danych

\* - zbyt mała ilość materiału genetycznego do oceny przy pomocy metody RQ-PCR

**Tabela 15b. Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i krwi w 30 dobie po alloNMSCT (metody STR-PCR i RQ-PCR)**

| Lp.                              | Biorca   | STR-PCR                    |                             | RQ-PCR                     |                             |
|----------------------------------|----------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                                  |          | Krew [% hematopoezy dawcy] | Szpik [% hematopoezy dawcy] | Krew [% hematopoezy dawcy] | Szpik [% hematopoezy dawcy] |
| 22                               | A.G.     | 100                        | X                           | 98,6                       | X                           |
| 23                               | B.W.     | 100                        | 91,4                        | 100                        | 86,3                        |
| 24                               | Z.J.II°  | 97,5                       | 96,5                        | 97,5                       | 85,5                        |
| 25                               | G.K.II°  | 96,6                       | 99,1                        | 98,2                       | *                           |
| 26                               | W.S      | 100                        | X                           | 99,3                       | X                           |
| 27                               | W.S.     | 92,6                       | 94,4                        | *                          | 99,9                        |
| 28                               | A.J.     | 95,2                       | X                           | 100                        | X                           |
| 29                               | S.T.     | 98,7                       | 98,7                        | 100                        | 100                         |
| 30                               | G.M.     | 100                        | X                           | 90,5                       | X                           |
| 31                               | G.K.II°  | 91,5                       | 89,5                        | *                          | 100                         |
| 32                               | A.H. II° | 95,8                       | 93,0                        | 93,0                       | *                           |
| 33                               | L.J.     | 94,3                       | 99,9                        | 100                        | 100                         |
| 34                               | J.Sz.    | 77,9                       | 85,3                        | *                          | 90,1                        |
| 35                               | W. Ż.    | 100                        | 93,7                        | 100                        | 100                         |
| 36                               | W.N.     | 69,0                       | X                           | 71,1                       | X                           |
| 37                               | A.N I°   | 46,4                       | 36,2                        | 55,3                       | 18,7                        |
| 38                               | A.N. II° | 2,6                        | 2,2                         | 0,4                        | 0,6                         |
| 39                               | Z.W.     | 78,8                       | X                           | 100                        | X                           |
| 40                               | A.S.     | 100                        | X                           | 99,9                       | X                           |
| 41                               | K.G.     | 76,0                       | X                           | *                          | X                           |
| 42                               | P.G.     | 100                        | 100                         | *                          | 98,2                        |
| 43                               | U.K.     | 100                        | X                           | 97,5                       | X                           |
| <b>Średnia arytmetyczna ± SD</b> |          | <b>92,8 ± 9,6</b>          | <b>94,7 ± 4,7</b>           | <b>96,37 ± 7,5</b>         | <b>95,56 ± 6,3</b>          |

Wynik przedstawiony jako średnia arytmetyczna z dwóch sekwencji STR (za wyjątkiem pacjenta G.M nr 30 w przypadku metody STR-PCR)

X – brak danych

\* - zbyt mała ilość materiału genetycznego do oceny przy pomocy metody RQ-PCR



**Tabela 16a. Czas wszczepienia molekularnego i wszczepienia hematologicznego u pacjentów poddanych alloHSCT**

| Lp.                           | Biorca  | Doba wszczepienia molekularnego (Dominacja alleli dawcy) | Doba wszczepienia molekularnego (Całkowity chimeryzm dawcy) | Doba wszczepienia hematologicznego |
|-------------------------------|---------|--|---|------------------------------------|
| 1                             | L.S.    | 2  | 28  | 16                                 |
| 2                             | Z.J. I° | 4  | 22  | 16                                 |
| 3                             | M.B.    | 10   | 14  | 16                                 |
| 4                             | G.K. I° | 4  | 28  | 21                                 |
| 5                             | G.S.    | 4  | 14  | 19                                 |
| 6                             | A.P.    | 8  | 21  | 15                                 |
| 7                             | T.G.    | 8  | X zgon  | X                                  |
| 8                             | K.Sz.   | 6  | 90  | 24                                 |
| 9                             | K.M.    | 10   | 14  | 16                                 |
| 10                            | M.K.    | 21   | 60  | 26                                 |
| 11                            | B.P.    | 4  | 21  | 17                                 |
| 12                            | R.B.    | 4  | 28  | 21                                 |
| 13                            | G.K. I° | 2  | 21  | 19                                 |
| 14                            | S.Ś.    | 10   | 28  | 25                                 |
| 15                            | A.H. I° | 4  | 21  | 17                                 |
| 16                            | D.L.    | 8  | 34  | 21                                 |
| 17                            | J.N.    | 6  | 28  | 18                                 |
| 18                            | A. W.   | 4  | 12  | 21                                 |
| 19                            | M.B.    | 2  | 21  | 19                                 |
| 20                            | M.M.    | 6  | 12  | Bez obniżenia parametrów           |
| 21                            | M. N.   | 8  | 28  | 29                                 |
| <b>Mediana</b>                |         | <b>6</b>   | <b>21</b>   | <b>19</b>                          |
| <b>Średnia arytmetyczna ±</b> |         | <b>6,4 ± 4,2</b>   | <b>27,3 ± 18,2</b>  | <b>19,8 ± 3,9</b>                  |

|           |  |  |  |
|-----------|--|--|--|
| <b>SD</b> |  |  |  |
|-----------|--|--|--|

X – nie stwierdzono wszczepienia

**Tabela 16b Czas wszczepienia molekularnego i wszczepienia hematologicznego u pacjentów poddanych alloNMSCT**

| Lp.                              | Biorca   | Doba wszczepienia molekularnego (Dominacja alleli dawcy) | Doba wszczepienia molekularnego (Całkowity chimeryzm dawcy) | Doba wszczepienia hematologicznego |
|----------------------------------|----------|--|---|------------------------------------|
| 22                               | A.G.     | 8  | 8   | 24                                 |
| 23                               | B.W.     | 2  | 21  | 19                                 |
| 24                               | Z.J.II°  | 21   | 21  | 16                                 |
| 25                               | G.K.II°  | 2  | 29  | 10                                 |
| 26                               | W.S      | 8  | 21  | 28                                 |
| 27                               | W.S.     | 2  | 29  | 25                                 |
| 28                               | A.J.     | 4  | 28  | 26                                 |
| 29                               | S.T.     | 2  | 8   | 11                                 |
| 30                               | G.M.     | 6  | 28  | 25                                 |
| 31                               | G.K.II°  | 2  | 29  | 25                                 |
| 32                               | A.H. II° | 2  | 10  | 15                                 |
| 33                               | L.J.     | 12   | 33  | 19                                 |
| 34                               | J.Sz.    | 12   | X   | 21                                 |
| 35                               | W. Ż.    | 10   | 28  | 18                                 |
| 36                               | W.N.     | 28   | 60  | 12                                 |
| 37                               | A.N I°   | X  | X   | 23                                 |
| 38                               | A.N. II° | X  | X   | 44                                 |
| 39                               | Z.W.     | 21   | 46  | 12                                 |
| 40                               | A.S.     | 2  | 21  | 21                                 |
| 41                               | K.G.     | 2  | 2   | 19                                 |
| 42                               | P.G.     | 4  | 28  | 15                                 |
| 43                               | U.K.     | 2  | 21  | 25                                 |
| <b>Mediana</b>                   |          | <b>4</b>   | <b>28</b>   | <b>20</b>                          |
| <b>Średnia arytmetyczna ± SD</b> |          | <b>7,6 ± 7,7</b>   | <b>24,8 ± 13,7</b>  | <b>20,6 ± 7,5</b>                  |

**Tabela 17a. Kinetyka chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloHSCT (metoda STR-PCR)**

| Lp | B     |    | +60  | +90  | +120 | +150 | +180 | +270 | +360 | +540 | +720 | Stan obecny         |
|----|-------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
| 1  | L.S   | PB | 100  | 88,8 | X    | 96,6 | 100  | 96,6 | 96,5 | 100  | 100  | Wznowa pozaszpikowa |
|    |       | BM | 100  | 68,1 | 99,5 | 92,3 | 99,1 | 98,9 | 98,8 | 100  | 96,7 |                     |
| 2  | Z.JI° | PB | 99,6 | X    | 90,8 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +120 doba |
|    |       | BM | 99,2 | 96,7 | 73,0 | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 3  | MB.   | PB | 89,5 | 100  | 94,6 | 99,2 | 96,9 | X    | -    | -    | -    | Remisja molekularna |
|    |       | BM | 89,9 | X    | 94,5 | X    | X    | 14,4 | -    | -    | -    |                     |
| 4  | GKI°  | PB | 91,2 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +77 doba  |
|    |       | BM | 96,6 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 5  | GS    | PB | 100  | X    | 97,8 | 96,9 | X    | 98,2 | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | X    | 95,3 | X    | X    | 99,2 | 98,4 | X    | 100  | -    |                     |
| 6  | AP    | PB | 97,4 | 93,4 | 94,1 | 94,2 | 96,0 | 98,7 | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | 96,9 | X    | X    | 99,2 | X    | X    | 100  | 100  | -    |                     |
| 8  | KSz.  | PB | 94,5 | X    | 94,3 | 98,7 | 97,4 | 100  | 100  | -    | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | X    | 94,7 | 94,9 | X    | X    | X    | X    | -    | -    |                     |
| 9  | KM    | PB | 99,4 | 98,8 | 97,4 | 98,1 | 97,5 | -    | -    | -    | -    | Zgon, GvHD +204     |
|    |       | BM | 96,8 | X    | 100  | X    | X    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 10 | MK    | PB | 99,4 | 48,8 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | Nawrót, zgon +104   |
|    |       | BM | 99,6 | X    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 11 | BP    | PB | 93,5 | 90,8 | 92,5 | 93,3 | 100  | 95,9 | 98,5 | 96,7 | 96,8 | Żywy, CR            |
|    |       | BM | X    | X    | X    | X    | 97,1 | 94,8 | 94,5 | X    | X    |                     |
| 12 | RB    | PB | X    | 100  | 95,5 | 96,1 | 97,9 | 100  | 100  | 100  | 100  | Żywy, CR            |
|    |       | BM | 100  | 100  | X    | X    | X    | X    | X    | X    | X    |                     |
| 13 | GKI°  | PB | 100  | 100  | 90,9 | 79,9 | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +153 doba |
|    |       | BM | X    | 100  | X    | 50,4 | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 14 | SŚ    | PB | 90,8 | 95,4 | 100  | 100  | 100  | 96,4 | 100  | 100  | 100  | Żywy, CR            |
|    |       | BM | X    | 98,2 | X    | 100  | 100  | X    | X    | X    | 100  |                     |
| 15 | AHI°  | PB | 100  | 99,2 | 99,1 | 98,3 | 99,3 | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +226      |
|    |       | BM | 97,7 | 98,1 | X    | X    | 95,6 | -    | -    | -    | -    |                     |
| 16 | DL    | PB | 89,5 | X    | 95,8 | 95,7 | 96,9 | 100  | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | 96,4 | 98,1 | X    | X    | X    | X    | 100  | X    | -    |                     |
| 17 | JN    | PB | 95,7 | 86,9 | 92,1 | 96,8 | 100  | 100  | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | X    | 95,7 | X    | X    | X    | 100  | 100  | 100  | -    |                     |
| 18 | A W   | PB | 95,7 | 94,4 | 95,6 | X    | 100  | 100  | 100  | -    | -    | Żywy, CR            |
|    |       | BM | 89,6 | X    | X    | 98,4 | 97,8 | X    | 100  | -    | -    |                     |
| 19 | MB    | PB | 92,8 | 95,4 | 88,4 | 83,7 | 85,3 | X    | 100  | 100  | -    | Żywy, CC            |
|    |       | BM | 87,6 | X    | X    | X    | X    | X    | 100  | 100  | -    |                     |
| 20 | MM    | PB | 98,2 | 99,5 | 100  | 100  | 100  | 100  | -    | -    | -    | Żywy, CC            |
|    |       | BM | X    | 98,3 | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    |                     |

|    |    |    |     |      |      |   |   |   |   |   |   |          |
|----|----|----|-----|------|------|---|---|---|---|---|---|----------|
| 21 | MN | PB | 100 | 92,6 | 96,3 |   |   | - | - | - | - | Żywy, MC |
|    |    | BM | 100 | X    | 77,6 | X | X | - | - | - | - |          |

PB- krew, BM - szpik CR – całkowita remisja, aGvHD – ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, CC- całkowity chimeryzm dawcy, MC- mieszany chimeryzm, X – brak materiału

**Tabela 17b. Kinetyka chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloNMSCT (metoda STR-PCR)**

| Lp | B        |    | +60  | +90  | +120 | +150 | +180 | +270 | +360 | +540 | +720 | Stan obecny                                    |
|----|----------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| 22 | A.G.     | PB | 100  | 100  | 98,8 | 100  | 100  | 100  | 100  | 98,5 | 100  | Żywy, wznowa pozaszpikowa CSN                  |
|    |          | BM | X    | 99,3 | 100  | 100  | 100  | X    | 100  | 95,8 | 100  |  |
| 23 | B.W.     | PB | 100  | 90,7 | 93,8 | 94,8 | 95,8 | 63,5 | 48,4 | -    | -    | Zgon, GvHD +450                                |
|    |          | BM | X    | 87,0 | X    | 94,4 | 96,4 | 50,3 | 48,6 | -    | -    |  |
| 24 | Z.J.II   | PB | 100  | 97,4 | 96,7 | 95,2 | 95,5 | -    | -    | -    | -    | Zgon, GvHD                                     |
|    |          | BM | 97,9 | 97,1 | X    | 99,4 | X    | -    | -    | -    | -    |  |
| 25 | G.K.I I° | PB | 98,5 | 97,2 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | Nawrót, zgon +89                               |
|    |          | BM | 99,5 | X    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  |
| 26 | W.S      | PB | 100  | 90,6 | 79,1 | 66   | 100  | 100  | 100  | 97,5 | 97,9 | Zgon, wznowa pozaszpikowa CSN +3 lata          |
|    |          | BM | X    | X    | 73,8 | X    | 100  | 100  | 100  | X    | 99,5 |  |
| 27 | W.S.     | PB | 93,1 | 79,8 | 22,3 | X    | 11,8 | 8,5  | 0    | 0    |      | Żywy, remisja, genotyp biorcy                  |
|    |          | BM | X    | X    | X    | X    | X    | X    | X    | X    | X    |  |
| 28 | A.J.     | PB | 95,9 | 100  | 100  | 8,8  | 100  | 100  | 100  | -    | -    | Żywy, CR po DLI                                |
|    |          | BM | X    | 100  | X    | X    | 100  | 91,8 | X    | -    | -    |  |
| 29 | S.T.     | PB | 100  | 100  | 97,2 | 97,1 | 97,5 | -    | -    | -    | -    | Żywy, cGvHD                                    |
|    |          | BM | 98,8 | 100  | X    | X    | 96,3 | -    | -    | -    | -    |  |
| 30 | G.M.     | PB | 100  | 71,4 | 72,6 | 56,6 | 62,5 | 75   | 85,0 | 0    | 6,9  | Żywy, remisja, genotyp biorcy                  |
|    |          | BM | X    | X    | 78,8 | X    | 75,5 | X    | 98,0 | 0    | X    |  |
| 31 | G.K.I I° | PB | X    | 78,2 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | Zgon, nawrót +107 doba                         |
|    |          | BM | 81,8 | 85,4 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |  |
| 32 | A.H. II° | PB | 100  | 97,6 | 94,9 | X    | 98,3 | 39,8 | -    | -    | -    | Zgon, wznowa +318 doba                         |
|    |          | BM | 99,8 | 48,4 | 17,2 | 19,1 | 89,7 | 17,1 | -    | -    | -    |  |
| 33 | L.J.     | PB | 100  | X    | 95,3 | 97,6 | 90,5 | 100  | -    | -    | -    | Żywy, CR                                       |
|    |          | BM | X    | X    | 96,3 | X    | 91,3 | X    | -    | -    | -    |  |
| 34 | J.Sz.    | PB | 89,4 | 84,4 | 49,0 | 17,7 | 27,2 | 96,6 | -    | -    | -    | Zgon, GvHD +333 doba                           |
|    |          | BM | 88,6 | 75,8 | 28,0 | X    | 7,9  | 96,3 | -    | -    | -    |  |
| 35 | W. Ż.    | PB | 94,8 | 94,4 | 92,1 | 100  | 100  | 97,6 | 97,3 | 100  | -    | Żywy, CR                                       |
|    |          | BM | X    | 98,8 | X    | X    | X    | 95,0 | X    | 95,5 | -    |  |
| 36 | W.N.     | PB | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | Żywy, CR                                       |
|    |          | BM | X    | X    | X    | X    | 100  | X    | 100  | X    | X    |  |
| 37 | A.NI     | PB | 45,9 | 35,3 | 0    | 3,0  | 2,3  | 0,8  | 2,0  | -    | -    | alloNMSCT +404 doba                            |
|    |          | BM | 18,4 | 15,3 | 2,2  | 6,3  | 2,9  | X    | 0,0  | -    | -    |  |
| 38 | A.N. II° | PB | 2,4  | 0    | 0    | 0    | 0    | -    | -    | -    | -    | Żywy, brak wszczepienia nawrót, genotyp biorcy |
|    |          | BM | 2,1  | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    | -    |  |
| 39 | Z.W.     | PB | 99,7 | 92,7 | 90,4 | 91,1 | 100  | -    | -    | -    | -    | Zgon, GvHD +223 doba                           |
|    |          | BM | 100  | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    | -    |  |

|    |      |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |          |
|----|------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| 40 | A.S. | PB | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | Żywy, CR |
|    |      | BM | X    | 100  | X    | X    | 100  | X    | 100  | 99,8 | 100  |          |
| 41 | K.G. | PB | 49,0 | 71,0 | 60,0 | X    | 66,4 | 92,6 | 83,1 | 76,2 | 76,3 | Żywy, MC |
|    |      | BM | X    | X    | X    | X    | 100  | X    | X    | 96,1 | X    |          |
| 42 | P.G. | PB | 77,8 | 84,4 | 82,1 | 75,9 | 88,6 | X    | 87,8 | -    | -    | Żywy, MC |
|    |      | BM | X    | X    | 86,9 | X    | X    | X    | X    | -    | -    |          |
| 43 | U.K. | PB | 98,1 | 97,8 | 97,6 | 99,0 | 99,1 | 100  | -    | -    | -    | Żywy, CC |
|    |      | BM | X    | X    | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    |          |

PB- krew, BM – szpik, CR – całkowita remisja, cGvHD – przewlekła postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, CC- całkowity chimeryzm dawcy, MC- mieszany chimeryzm, X – brak materiału

**Tabela 18a. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloHSCT (metoda RQ-PCR)**

| Lp | B      |    | +60  | +90  | +120 | +150 | +180 | +270 | +360 | +540 | +720 | Stan obecny         |
|----|--------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
| 1  | L.S    | PB | 98,8 | 98,4 | X    | 99,9 | 97,9 | 98,5 | 99,5 | 99,9 | 99,6 | Wznowa pozaszpikowa |
|    |        | BM | 89,4 | 98,2 | 99,4 | 99,2 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 98,4 |                     |
| 2  | Z.J I° | PB | *    | X    | 78,4 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +120 doba |
|    |        | BM | *    | 89,4 | 92,2 | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 3  | MB.    | PB | 95,8 | 91,8 | 87,2 | 95,9 | 100  | X    | -    | -    | -    | Remisja molekularna |
|    |        | BM | 95,6 | X    |      | X    | X    |      | -    | -    | -    |                     |
| 4  | GK I°  | PB | 100  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +77 doba  |
|    |        | BM | 100  | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 5  | GS     | PB | 100  | X    | 100  | 100  | X    | X    | 100  | 100  | -    | Żywy CR             |
|    |        | BM | X    | 100  | X    | X    | 100  | 92,2 | X    | 99,8 | -    |                     |
| 6  | AP     | PB | 100  | 100  | 100  | 92,8 | 100  | 100  | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |        | BM | 93,1 | X    | X    |      | X    | X    | 100  | 100  | -    |                     |
| 8  | KSz.   | PB | 98,4 | X    | 98,8 | 99,3 | 98,4 | 98,6 | 99,2 | -    | -    | Żywy, CR            |
|    |        | BM | X    | 98,9 | 99,1 | X    | X    | X    | X    | -    | -    |                     |
| 9  | KM     | PB | 94,1 | 96,1 | 99,5 | 100  | 100  | -    | -    | -    | -    | Zgon, GvHD +204     |
|    |        | BM | 95,8 | X    | 100  | X    | X    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 10 | MK     | PB | 100  | 79,2 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | Nawrót, zgon +104   |
|    |        | BM | 96,0 | X    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 11 | BP     | PB | X    | 97,3 | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 96,8 | Żywy, CR            |
|    |        | BM | X    | X    | X    | X    | 100  | 100  | 100  | 100  | X    |                     |
| 12 | RB     | PB | X    | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | Żywy, CR            |
|    |        | BM | 100  | 100  | X    | X    | X    | X    | X    | X    | X    |                     |
| 13 | GK I°  | PB | 100  | 100  | 84,1 | 4,6  | -    | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +153 doba |
|    |        | BM | X    | 75,2 | X    | 77,3 | -    | -    | -    | -    | -    |                     |
| 14 | SŚ     | PB | 97,3 | 96,5 | 97,9 | 97,9 | 98,5 | 94,8 | 95,8 | 92,4 | 98,2 | Żywy, CR            |
|    |        | BM | X    | 98,2 | X    | 95,4 | 97,2 | X    | X    | X    | 96,7 |                     |
| 15 | AH I°  | PB | 94,5 | 87,6 | 74,5 | 79,5 | 95,2 | -    | -    | -    | -    | alloNMSCT +226      |
|    |        | BM | 92,1 | *    | X    | X    | 96,8 | -    | -    | -    | -    |                     |
| 16 | DL     | PB | 100  | X    | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | -    | Żywy, CR            |
|    |        | BM | 100  | 100  | X    | X    | X    | X    | 100  | X    | -    |                     |
| 17 | JN     | PB | 96,9 | 91,8 | 94,3 | 94,4 | 97,5 | 100  | 98,7 | 99,2 | -    | Żywy, CR            |
|    |        | BM | X    | 100  | X    | X    | X    | 97,8 | 100  | 98,5 | -    |                     |
| 18 | A W    | PB | 100  | 100  | 100  | X    | 100  | 100  | 100  | -    | -    | Żywy, CR            |
|    |        | BM | 72,9 | X    | X    | 100  | 100  | X    | 100  | -    | -    |                     |
| 19 | MB     | PB | 98,7 | 82,7 | 100  | 65,3 | 53,8 | X    | 100  | 100  | -    | Żywy, CC            |
|    |        | BM | 97,2 | X    | X    | X    | X    | X    | 100  | 100  | -    |                     |
| 20 | MM     | PB | 94,8 | 100  | 99,4 | 100  | 98,3 | 99,2 | -    | -    | -    | Żywy, CC            |
|    |        | BM | X    | 98,6 | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    |                     |
| 21 | M N    | PB | 99,8 | 99,9 | 99,3 | 99,9 | 99,9 | -    | -    | -    | -    | Żywy, CC            |
|    |        | BM | 99,9 | X    | 99,9 | X    | X    | -    | -    | -    | -    |                     |

PB- krew, BM - szpik CR – całkowita remisja, aGvHD – ostra postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, CC- całkowity chimeryzm dawcy, MC- mieszany chimeryzm, X – brak materiału, \* - zbyt mała ilość DNA

**Tabela 18b. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloNMSCT (metoda RQ-PCR)**

| Lp | B        |    | +60  | +90   | +120  | +150       | +180       | +270       | +360       | +540 | +720  | Stan obecny                           |
|----|----------|----|------|-------|-------|------------|------------|------------|------------|------|-------|---------------------------------------|
| 22 | A.G.     | PB | 98,2 | 99,5  | 100   | 99,1       | 98,8       | 99,2       | 95,9       | 93,2 | 98,6  | Żywy, wznowa pozaszpikowa CSN         |
|    |          | BM | X    | 98,3  | 99,7  | 98,6       | 97,2       | X          | 95,4       | 96,7 | 95,7  |                                       |
| 23 | B.W.     | PB | 100  | 92,7  | 100   | 100        | 71,4       | 73,7       | 15,3       | -    | -     | Zgon, GvHD +450                       |
|    |          | BM | X    | 67,9  | X     | 98,2       | 100        | 32,7       | 90,0       | -    | -     |                                       |
| 24 | Z.J.II   | PB | 100  | 96,4  | 97,3  | 95,7       | 96,6       | -          | -          | -    | -     | Zgon, GvHD                            |
|    |          | BM | 100  | 98,2  | X     | 93,4       | X          | -          | -          | -    | -     |                                       |
| 25 | G.K. II° | PB | 100  | 100   | -     | -          | -          | -          | -          | -    | -     | Nawrót, zgon +89                      |
|    |          | BM | 97,9 | X     | -     | -          | -          | -          | -          | -    | -     |                                       |
| 26 | W.S      | PB | 98,9 | 98,2  | 91,8  | 70,9       | 97,8       | 99,2       | 98,5       | 97,8 | 98,8  | Zgon, wznowa pozaszpikowa CSN +3 lata |
|    |          | BM | X    | X     | 96,2  | X          | 99,8       | 98,6       | 80,1       | X    | 99,5  |                                       |
| 27 | W.S.     | PB | 68,9 | 73,7  | 11,1  | X          | 15,2       | *          | 13,4       | 10,9 | 9,9   | Żywy, remisja, genotyp biorcy         |
|    |          | BM | X    | X     | X     | X          | X          | X          | X          | X    | X     |                                       |
| 28 | A.J.     | PB | 100  | X     | 89,0  | 20,8       | 89,6       | 100        | 100        | -    | -     | Żywy, CR po DLI                       |
|    |          | BM | X    | 100   | X     | X          | 100        | 100        | X          | -    | -     |                                       |
| 29 | S.T.     | PB | 100  | 100   | 94,1  | 95,1       | 99,8       | -          | -          | -    | -     | Żywy, cGvHD                           |
|    |          | BM | 100  | 100   | X     | X          | 100        | -          | -          | -    | -     |                                       |
| 30 | G.M.     | PB | 100  | 50,6  | 54,4  | 51,2       | 100        | 82,1       | 99,9       | 0,02 | 0,005 | Żywy, remisja, genotyp biorcy         |
|    |          | BM | X    | X     | 100   | X          | 71,2       | X          | 85,6       |      | X     |                                       |
| 31 | G.K. II° | PB | X    | 85,3  | -     | -          | -          | -          | -          | -    | -     | Zgon, nawrót +107 doba                |
|    |          | BM | 75,5 | 14,7  | -     | -          | -          | -          | -          | -    | -     |                                       |
| 32 | A.H. II° | PB | 100  | 100   | 83,9  | X          | 100        | 32,5       | -          | -    | -     | Zgon, wznowa +318 doba                |
|    |          | BM | 100  | 46,4  | 6,6   | 65,7       | 88         | 7,4        | -          | -    | -     |                                       |
| 33 | L.J.     | PB | 94,2 | X     | 97,8  | 91,1       | 93,7       | 98,6       | -          | -    | -     | Żywy, CR                              |
|    |          | BM | X    | X     | 98,9  | X          | 100        | X          | -          | -    | -     |                                       |
| 34 | J.Sz.    | PB | 92,3 | 87,9  | 58,5  | 31,2       | 29,4       | 99,9       | -          | -    | -     | Zgon, GvHD +333 doba                  |
|    |          | BM | 94,5 | 75,8  | 39,7  | X          | 8,4        | 98,7       | -          | -    | -     |                                       |
| 35 | W. Ż.    | PB | 100  | 99,3  | 92,4  | 100        | 95,4       | 100        | 99,8       | 99,6 | -     | Żywy, CR                              |
|    |          | BM | X    | 98,4  | X     | X          | X          | 100        | X          | 99,9 | -     |                                       |
| 36 | W.N.     | PB | 100  | 100   | 100   | 100        | 100        | 100        | 100        | 100  | 100   | Żywy, CR                              |
|    |          | BM | X    | X     | X     | X          | 100        | X          | 100        | X    | X     |                                       |
| 37 | A.N I°   | PB | 45,6 | 39,8  | 0,1   | 0,000<br>1 | 0,000<br>8 | 0,000<br>4 | 0,000<br>6 | -    | -     | alloNMSCT +404 doba                   |
|    |          | BM | 16,4 | 12,1  | 0,008 |            |            | X          |            | -    | -     |                                       |
| 38 | A.N. II° | PB | 0,04 | 0,001 | 0,005 | 0,000<br>5 | 0,002      | -          | -          | -    | -     | Żywy, brak wszczepienia nawrót,       |
|    |          | BM | 0,05 | X     | X     | X          | X          | -          | -          | -    | -     |                                       |

|    |      |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                         |
|----|------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------------|
| 39 | Z.W. | PB | 100  | 100  | 100  | 98,4 | 100  | -    | -    | -    | -    | Zgon, GvHD<br>+223 doba |
|    |      | BM | 100  | X    | X    | X    | X    | -    | -    | -    | -    |                         |
| 40 | A.S. | PB | 99,9 | 99,2 | 99,4 | 96,5 | 95,4 | 96,9 | 95,1 | 99,7 | 96,8 | Żywy, CR                |
|    |      | BM | X    | 98,2 | X    | X    | 99,9 | X    | 96,3 | 98,4 | 98,7 |                         |
| 41 | K.G. | PB | *    | *    | 65,2 | X    | 84,5 | 100  | 97,2 | 75,9 | 69,1 | Żywy, MC                |
|    |      | BM | X    | X    | X    | X    | 100  | X    | X    | 92,1 | X    |                         |
| 42 | P.G. | PB | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | X    | 94,5 | -    | -    | Żywy, MC                |
|    |      | BM | X    | X    | 95,1 | X    | X    | X    | X    | -    | -    |                         |
| 43 | U.K. | PB | 95,9 | 98,6 | X    | *    | 98,6 | 96,9 | -    | -    | -    | Żywy, CC                |
|    |      | BM | X    | X    | 97,2 | X    | X    | X    | -    | -    | -    |                         |

PB- krew, BM – szpik, CR – całkowita remisja, cGvHD – przewlekła postać choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, CC- całkowity chimeryzm dawcy, MC- mieszany chimeryzm, X – brak materiału, \* - zbyt mała ilość DNA

**Tabela 19. Wyniki rozmazu szpiku kostnego – wybrane elementy u pacjentki GM**

| Układ                       | Procent komórek |                 | Wartości prawidłowe [%] |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| <b>Układ granulocytarny</b> |                 |                 |                         |
|                             | <b>27 doba</b>  | <b>578 doba</b> |                         |
| Mieloblasty                 | 4,2             | 0,5             | 0,5 – 3,0               |
| Promielocyty                | 4,0             | 1,5             | 0,5 – 5,0               |
| Mielocyty obojętnochłonne   | 3,2             | 1,0             | 5,0 – 18,0              |
| Mielocyty kwasochłonne      |                 |                 | 0,5 – 2,5               |
| Mielocyty zasadochłonne     |                 |                 | 0,0 – 0,3               |
| Pałeczki obojętnochłonne    |                 | 13,0            | 10,0 – 27,0             |
| Pałeczki kwasochłonne       |                 |                 | 0,4 – 27,0              |
| Pałeczki zasadochłonne      |                 |                 | 0,0 - 0,1               |
| Podzielone obojętnochłonne  |                 | 35,5            | 11,0 – 20,0             |
| Podzielone kwasochłonne     |                 |                 | 0,4 – 3,0               |
| Podzielone zasadochłonne    |                 |                 | 0,0 – 0,5               |
| <b>Utkanie chłonne</b>      |                 |                 |                         |
|                             | <b>27 doba</b>  | <b>578 doba</b> |                         |
| Limfoblasty                 |                 |                 | 0,0                     |
| Limfocyty                   | 6,2             | 36,0            | 3,0 – 12,0              |
| <b>Utkanie siateczki</b>    |                 |                 |                         |
|                             | <b>27 doba</b>  | <b>578 doba</b> |                         |
| Monoblasty                  |                 |                 | 0,0                     |
| Monocyty                    | 10,8            | 1,5             | 0,0 -2,5                |
| Plazmoblasty                |                 |                 | 0,0                     |
| Plazmocyty                  |                 |                 | 0,2 – 2,0               |

**Tabela 20. Występowanie aGvHD w badanej populacji**

| alloHSCT     |              | alloNMSCT     |              |
|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Pacjent      | aGvHD        | Pacjent       | aGvHD        |
| L.S. (1)     | I/II         | A.G. (22)     | I            |
| Z.J. I° (2)  | I/II         | B.W. (23)     | 0            |
| M.B. (3)     | 0            | Z.J.II° (24)  | III          |
| G.K. I° (4)  | I            | G.K.II° (25)  | 0            |
| G.S. (5)     | I/II         | W.S (26)      | I/II         |
| A.P. (6)     | I            | W.S. (27)     | 0            |
| T.G. (7)     | II           | A.J. (28)     | 0            |
| K.Sz. (8)    | 0            | S.T. (29)     | 0            |
| K.M. (9)     | I            | G.M. (30)     | I/II         |
| M.K. (10)    | 0            | G.K.II° (31)  | I            |
| B.P. (11)    | I            | A.H. II° (32) | II           |
| R.B. (12)    | 0            | L.J. (33)     | 0            |
| G.K. I° (13) | I            | J.Sz. (34)    | III          |
| S.Ś. (14)    | 0            | W. Ż. (35)    | I            |
| A.H. I° (15) | II           | W.N. (36)     | 0            |
| D.L. (16)    | I            | A.N I° (37)   | I            |
| J.N. (17)    | I            | A.N. II° (38) | 0            |
| A. W. (18)   | I            | Z.W. (39)     | I            |
| M.B. (19)    | I            | A.S. (40)     | 0            |
| M.M. (20)    | III          | K.G. (41)     | I            |
| M. N. (21)   | 0            | P.G. (42)     | I            |
|              |              | U.K. (43)     | 0            |
| <b>RAZEM</b> | <b>15/21</b> |               | <b>12/22</b> |



---

## SPIS TABEL

|   |                  |
|---|------------------|
| <b>Tabela 1.</b> Wskazania do alloSCT.....  | <b>15</b>        |
| <b><i>Tabela 2. Czulość metod stosowanych do oceny chimeryzmu.....</i></b>  | <b><i>25</i></b> |
| <b>Tabela 3a.</b> Charakterystyka badanej grupy - kondycjonowanie mieloablacyjne.....   | <b>109</b>       |
| <b>Tabela 3b.</b> Charakterystyka badanej grupy - kondycjonowanie niemieloablacyjne.....  | <b>110</b>       |
| <b>Tabela 4.</b> Charakterystyka sekwencji STR.....   | <b>111</b>       |
| <b>Tabela 5.</b> Charakterystyka starterów zastosowanych w reakcji STR-PCR.....   | <b>111</b>       |
| <b>Tabela 6.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę AmpliTaq GOLD.....   | <b>112</b>       |
| <b>Tabela 7.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę Fast Start Taq DNA.....  | <b>112</b>       |
| <b>Tabela 8.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej zawierającej barwnik SYBR green.....   | <b>112</b>       |
| <b>Tabela 9.</b> Charakterystyka starterów używanych w reakcji RQ-PCR.....  | <b>113</b>       |
| <b>Tabela 10.</b> Informatywne sekwencje STR o wysokim stopniu polimorfizmu.....  | <b>114</b>       |
| <b>Tabela 11.</b> Częstość występowania informatywnych loci STR (metoda STR-PCR)...   | <b>115</b>       |
| <b>Tabela 12.</b> Informatywne sekwencje o dwuallelicznym polimorfizmie.....  | <b>115</b>       |
| <b>Tabela 13.</b> Porównanie czulości metody STR-PCR i RQ-PCR.....  | <b>117</b>       |
| <b>Tabela 14a.</b> Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego w grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu mieloablacyjnemu.....    | <b>117</b>       |
| <b>Tabela 14b.</b> Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego w grupie pacjentów poddanych kondycjonowaniu niemieloablacyjnemu..... | <b>118</b>       |
| <b>Tabela 15a.</b> Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i krwi w 30 dobie po alloSCT (metody STR-PCR i RQ-PCR).....               | <b>119</b>       |
| <b>Tabela 15b.</b> Porównanie poziomu chimeryzmu w szpiku i krwi w 30 dobie po alloNMSCT (metody STR-PCR i RQ-PCR).....             | <b>120</b>       |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabela 16a.</b> Czas wszczepienia molekularnego i wszczepienia hematologicznego u pacjentów poddanych alloHSCT.....      | <b>121</b> |
| <b>Tabela 16b</b> Czas wszczepienia molekularnego i wszczepienia hematologicznego u pacjentów poddanych alloNMSCT.....      | <b>122</b> |
| <b>Tabela 17a.</b> Kinetyka chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloHSCT (metoda STR-PCR).....  | <b>123</b> |
| <b>Tabela 17b.</b> Kinetyka chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloNMSCT (metoda STR-PCR)..... | <b>124</b> |
| <b>Tabela 18a.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloHSCT (metoda RQ-PCR).....     | <b>125</b> |
| <b>Tabela 18b.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego powyżej doby 30 – pacjenci poddani alloNMSCT (metoda RQ-PCR).....    | <b>126</b> |
| <b>Tabela 19.</b> Wyniki rozmazu szpiku kostnego – wybrane elementy u pacjentki GM.....                                     | <b>127</b> |
| <b>Tabela 20.</b> Występowanie aGvHD w badanej populacji.....   | <b>128</b> |

---

## SPIS RYCIN

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Rycina 1.</b> Schemat hematopoezy.....  | <b>13</b> |
| <b>Rycina 2.</b> Schemat powstawania chimeryzmu.....   | <b>20</b> |
| <b>Rycina 3.</b> Rozkład płci biorców .....  | <b>28</b> |
| <b>Rycina 4.</b> Układ płci w parach biorca / dawca.....   | <b>28</b> |
| <b>Rycina 5.</b> Schematycznie przedstawiona zasada reakcji PCR.....   | <b>34</b> |
| <b>Rycina 6.</b> Schemat technologii opartej na zastosowaniu barwnika SYBR green.....  | <b>40</b> |
| <b>Rycina 7.</b> Typy wzorów allelicznych uzyskanych metodą STR-PCR.....   | <b>43</b> |
| <b>Rycina 8.</b> Przykładowy profil genetyczny ustalony metodą RQ-PCR.....   | <b>44</b> |
| <b>Rycina 9.</b> Gen GAPDH - rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym.....   | <b>45</b> |
| <b>Rycina 10.</b> Informatywność <i>loci</i> genowych o dwuallelicznym polimorfizmie.....  | <b>47</b> |
| <b>Rycina 11.</b> Czulość metod STR-PCR i RQ-PCR.....  | <b>48</b> |
| <b>Rycina 12.</b> Wykres obrazujący przebieg amplifikacji produktu w czasie rzeczywistym – wydruk z aparatu.....   | <b>49</b> |
| <b>Rycina 13.</b> Krzywa standardowa dla metody RQ-PCR – wydruk z aparatu.....   | <b>49</b> |
| <b>Rycina 14</b> Wczesna ocena chimeryzmu hematopoetycznego.....   | <b>50</b> |
| <b>Rycina 15.</b> Poziom chimeryzmu u pacjentów poddanych alloHSCT oraz alloNMSCT oceniony przy pomocy metod STR-PCR i RQ-PCR (szpik vs krew doba 30)..... | <b>51</b> |
| <b>Rycina 16.</b> Czas wszczepienia molekularnego a rodzaj źródła macierzystych komórek hematopoetycznych.....   | <b>53</b> |
| <b>Rycina 17.</b> Czas wszczepienia molekularnego a ilość podanych komórek CD34+.....  | <b>54</b> |
| <b>Rycina 18.</b> Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oznaczonego przy pomocy metody STR-PCR a obecność komórek CD5+/CD19+.....                            | <b>56</b> |
| <b>Rycina 19.</b> Poziom chimeryzmu hematopoetycznego oznaczonego przy pomocy metody RQ-PCR a obecność komórek CD5+/CD19+.....                             | <b>57</b> |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Rycina 20.</b> Chimeryzm hematopoetyczny a chemioterapia (STR-PCR).....  | <b>58</b> |
| <b>Rycina 21.</b> Monitorowanie obecności transkryptu aml/eto metodą RT-PCR (p. AJ).....  | <b>59</b> |
| <b>Rycina 22.</b> Chimeryzm hematopoetyczny a chemioterapia (RQ-PCR).....   | <b>60</b> |
| <b>Rycina 23.</b> Utrata przeszczepu bez nawrotu choroby podstawowej (STR-PCR) Pacjentka GM (nr 27).....  | <b>61</b> |
| <b>Rycina 24.</b> Utrata przeszczepu bez nawrotu choroby podstawowej (RQ-PCR).....  | <b>62</b> |
| <b>Rycina 25</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentki AW (STR-PCR).....  | <b>63</b> |
| <b>Rycina 26.</b> Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp b <sub>2</sub> a <sub>2</sub> metodą RT-PCR (pacjentka AW).....  | <b>64</b> |
| <b>Rycina 27.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentki AW (RQ-PCR).....  | <b>65</b> |
| <b>Rycina 28.</b> Osiągnięcie CC a występowanie GvHD Pacjent ZJ (STR-PCR).....  | <b>66</b> |
| <b>Rycina 29.</b> Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp e <sub>1</sub> a <sub>2</sub> przy pomocy metody RT-PCR (pacjent ZJ).....                              | <b>67</b> |
| <b>Rycina 30.</b> Osiągnięcie CC a występowanie GvHD Pacjent ZJ (RQ-PCR).....   | <b>68</b> |
| <b>Rycina 31.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego pod wpływem leczenia immunosupresyjnego. Pacjent JSz (STR-PCR).....   | <b>69</b> |
| <b>Rycina 32.</b> Monitorowanie obecności transkryptu bcr/abl podtyp b <sub>2</sub> a <sub>2</sub> metodą RT-PCR (pacjent JSz).....   | <b>70</b> |
| <b>Rycina 33.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego pod wpływem leczenia immunosupresyjnego. Pacjent JSz (RQ-PCR).....  | <b>71</b> |
| <b>Rycina 34.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego a nawrót pozaszpikowy. Pacjent ZW (STR-PCR).....  | <b>72</b> |
| <b>Rycina 35.</b> Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego a nawrót pozaszpikowy. Pacjent ZW (RQ-PCR).....   | <b>72</b> |
| <b>Rycina 36.</b> Kinetyka chimeryzmu hematopoezy u pacjentki AH poddanej DLI. (STR-PCR)  | <b>73</b> |
| <b>Rycina 37.</b> Kinetyka chimeryzmu hematopoezy u pacjentki AH poddanej DLI. (RQ-PCR)..   | <b>74</b> |
| <b>Rycina 38.</b> Różnice zmian chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji komórek CD3+, niefrakcjonowanej krwi obwodowej i szpiku kostnym. Pacjentka GM (STR-PCR).....    | <b>75</b> |
| <b>Rycina 39.</b> Różnice w zmianach chimeryzmu hematopoetycznego w subpopulacji komórek CD3+, niefrakcjonowanej krwi obwodowej i szpiku kostnym. Pacjentka GM (RQ-PCR).... | <b>76</b> |
| <b>Rycina 40.</b> Chimeryzm hematopoezy a aGvHD w grupie pacjentów po alloHSCT.....   | <b>77</b> |
| <b>Rycina 41.</b> Chimeryzm hematopoezy a aGvHD u pacjentów po alloNMSCT.....   | <b>77</b> |
| <b>Rycina 42.</b> Całkowity chimeryzm hematopoetyczny u pacjenta MM z vSAA (STR-PCR i RQ-PCR).....  | <b>78</b> |

---

**Rycina 43.** Mieszany chimeryzm hematopoetyczny u pacjentki MB z vSAA (STR-PCR i RQ-PCR).....79

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Janicki K, *Hematologia Kliniczna tom I Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991: 1-610*
2. Skotnicki AB, Jabłoński M, Szostek M, Libura M *Charakterystyka macierzystej komórki hemopoezy i jej biologicznego markera – molekuly CD34 Przegląd Lekarski 1999, 56 suplement 1: 17-21*
3. Dmoszyńska A, Robak T *Podstawy hematologii Wydawnictwo CEZELEJ, Lublin 2003: 1-502*
4. Skotnicki AB, Nowak W *Podstawy hematologii dla studentów i lekarzy Medycyna Praktyczna, Kraków 1998: 1-177*
5. Cavazzana-Calvo M, Six E, Andre-Schmutz I, Coulombel L *Human hematopoiesis: from CD34 cells to T lymphocytes Médecine sciences 2007 Feb;23(2):151-159*
6. Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Dharma RK, Chandra R, Lutra PM *Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing Stem cells and development 2006 Jun;15(3):305-313*
7. Chute JP *Stem cell homing Current opinion in hematology 2006: 13: 399-406*
8. Skotnicki AB, Machaczka M *Założenia i metody chemioterapii wysokodozowanej w onkologii Przegląd Lekarski 1999, 56 suplement 1: 5-9*
9. Byrne JL, Stainer C, Cull G, Haynes AP, Bessell EM, Hale G, Walkman H, Russell NH *The effect of the serotherapy regimen used and the marrow cell dose received on rejection, graft-versus-host disease and outcome following unrelated donor bone marrow transplantation for leukaemia Bone Marrow Transplantation 2000 25: 411-417*
10. Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, Geary J, Thuraisundarama D, Branson K, Chakrabarti S, Mehendra P, Craddock Ch, Parker A, Hunter A, Hale G, Waldmann H, Willimas CD, Yong K, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S *Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell trans[plantation] by using a nonmyeloablative conditioning regimen Blood 2002, 99(3): 1071-1078*
11. Skotnicki AB, Zawirska D, Nowak W *Ogólna charakterystyka, podstawy i procedury*

- 
- wysokodozowanej chemioterapii wspomaganej przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych **Przegląd Lekarski 1999, 56 suplement 1: 10-16**
12. Kumar S, Chen MG, Gastineau DA, Gertz MA, Inwards DJ, Lacy MQ, Tefferi A, Litzow MR *Effect of slow lymphocyte recovery and type of graft-versus-host disease prophylaxis on relapse after allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia* **Bone Marrow Transplantation 2001, 28: 951-956**
  13. Shimoni A, Nagler A. *Non myeloablative stem cell transplantation (NST): chimerism testing as guidance for immune-therapeutic manipulations* **Leukemia 2001, 15: 1967-1975**
  14. Little MT, Storb R *History of Haematopoietic stem-cell transplantation* **Nature Reviews 2002, 2:231-238**
  15. van Hoef MEHM *HLA-identical sibling peripheral blood progenitor cell transplants (PBPCT)* **Bone Marrow Transplantation 1999, 24:707-714**
  16. Auffermann-Gretzinger S, Lossos IS, Vayntrub TA, Leong W, Grumet FC, Blume KG, Stockerl-Goldstein KE, Levy R, Shizuru JA *Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients* **Blood 2002, 99: 1442-1448**
  17. Klanginsirikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russel NH *Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution* **Blood 2002 99: 2586-2591**
  18. Popplewell LL, Forman SJ *Is there an upper limit for bone marrow transplantation?* **Bone Marrow Transplantation 2002, 29:277-284**
  19. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Grimm AA, Rindgén O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM *Graft-Versus-Leukemia reactions after bone marrow transplantation* **Blood 1990,75(3):555-562**
  20. Spitzer TR *Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation* **Bone Marrow Transplantation 2001, 27: 893-898**
  21. McSweeney PA, Storb R *Mixed chimerism: preclinical studies and clinical applications* **Biology of Blood and Marrow Transplantation 1999, 5:192-203**
  22. Riddel SR, Berger C, Murata M, Randolph S, Warren EH *The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* **Blood Reviews 2003, 17: 153-162**
  23. Au WY, Lie AKW, Lee CK, Liang R, Kwong YL *Donor lymphocyte infusion induced molecular remission in relapse of acute myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation* **Bone Marrow Transplantation 1999, 23: 1201-1203**
  24. Gardiner N, McCane SR, O'Riordan J, Lawrer M *Chimerism following donor lymphocyte infusion for chronic myeloid leukemia* **Blood 1999, 93(8): 2748-2749**
  25. Rapanotti MC, Arcese W, Buffolino S, Iori AP, Mengarelli A, De Cuiua MR, Cardillo A and

- 
- Cimino G *Sequential molecular monitoring of chimerism in chronic myeloid leukemia patients receiving donor lymphocyte transfusion for relapse after bone marrow transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 1997, **19**: 703-707
26. Bacigalupo A *Hematopoietic stem cell transplants after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)* **Bone Marrow Transplantation** 2000, **25**: 803-805
27. de Vries-van der Zwan A, van der Pol MA, Besseling AC, de Waal LP, Boog CJP *Haematopoietic stem cells can induce specific skin graft acceptance across full MHC barriers* **Bone Marrow Transplantation** 1998, **22**:91-98
28. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar Ch, Ben-Tal O, Eldor A and Or R, *Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases*, **Blood** 1998, **91** (3): 756-763
29. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H and Lion T *Kinetics of chimerism during the post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection*, **Leukemia** 1999, **13**: 2060-2069
30. Ortega M, Escudero T, Caballin MR, Olive T, Ortega JJ, Coll MD *Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants* **Bone Marrow Transplantation** 1999, **24**:81-87
31. Thiede C, Börnhäuser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxeberg H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A and Ehninger G *Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers* **Leukemia** 2001, **15**: 293-302
32. Najfeld V, Burnett W, Vlachos A, Scigliano E, Isola L, Fruchtman S *Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes* **Bone Marrow Transplantation** 1997, **19**: 829-834
33. Blazar BR, Orr HT, Arthur DC, Kersey JH, Filipovich AH *Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation* **Blood** 1985, **66**(6): 1436-1444
34. Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R *Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA* **Nucleic Acids Research** 1996, **24**(14): 2807-2812
35. Antin JH, Childs R, Filipovich L, Giralto S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D

- 
- Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendation from a workshop at the 2001 tandem meetings* **Biol Blood Marrow Transplant** **2001, 7(19): 477-485**
36. Choi SJ, Lee KH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, Kim SH, Park CJ, Chi HS Kim WK *Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients in acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study* **Bone Marrow Transplantation** **2000, 26: 327-332**
37. Lawler M, Humphries P, McCann SR *Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction* **Blood** **1991, 11: 2504-2514**
38. González M, López-Pérez R, García-Sanz R, Pérez-Simón JA, San Miguel JF *Debate Round Table: Comments concerning chimerism studies* **Leukemia** **2001, 15:1986-1988**
39. Schiman SA, Suesse P, Vertino AM and Gray PS *Comparison of short tandem repeat and variable number tandem repeat genetic markers for quantitative determination of allogeneic bone marrow transplant engraftment* **Bone Marrow Transplantation** **2002, 29: 243-248**
40. Wilhelm J, Pingoud A *Real-Time Polymerase Chain Reaction* **ChemBioChem** **2003, 4:1120-1128**
41. Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M *Detection and quantification of insertion/deletions variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis* **Biol Chem** **2002, 383(9): 1423-1433**
42. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, de Witte T, Schattenberg A, van de Wiel-van Kemenade E *Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR on single nucleotide polymorphism* **Leukemia** **2003, 17:621-629**
43. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac Ch, Birebent B, Lapart Ch, Lamy T, Le Prisé PY, Beauplet A, Bories D, Semana G and Quelvennec E *Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction* **Blood** **2002, 99: 4618-4625**
44. Luhm RA, Bellissimo DB, Uzgiris AJ, Drobylski WR, Hessner MJ *Quantitative evaluation of post-bone marrow transplant engraftment status using fluorescent labeled variable number of tandem repeats* **Molecular Diagnosis** **2000, 5(2): 17:20-17:29**
45. Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, Rotter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A *Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection* **Bone Marrow Transplantation** **1999, 23: 1055-1060**
46. Nollet F, Billiet J, Selleslag D, Criel A *Standardization of multiplex fluorescent short*



- 
- tandem repeat analysis for chimerism testing* **Bone Marrow Transplantation** 2001, 28: 511-518
47. Lion T *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection* **Leukemia** 2001, 15:303-306
48. Schaap N, Schattenberg A, Bär B, Preijers F, van de Wiel van Kemenade E, de Witte T *Induction of graft-versus-leukemia to prevent relapse after partially lymphocyte-depleted allogeneic bone marrow transplantation by pre-emptive donor leukocyte infusion* **Leukemia** 2001, 15: 1339-1346
49. Gardiner N, Lawrer M, O'Riordan JM, De Arce M Humpries P, McCann SR *Persistent donor chimaerism in consistent with disease-free survival following BMT for chronic myeloid leukaemia* **Bone Marrow Transplantation** 1997, 20:235-241
50. Socie G, Lawrer M, Gluckam E, McCane SR, Brison O *Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era* **Leukemia Research** 1995, 19(8):497-504
51. Mangioni S, Balduzzi A, Rivolta A, Rovelli A, Nesi F, Rossi V, Busca A, Uderzo C, Miniero R, Biondi A *Long-term persistence of hemopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 1997, 20:959-973
52. Gonzalez M, Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Perez-Simon JA, San Miguel JF *Debate*
- Round-Table: Comments concerning chimerism studies* **Leukemia** 2001, 15:1986-1988
53. Serrano J, Román, Herrera C, Castillejo JA, Navarro Ja, Reina ML, González MG, Rodriguez MC, Pascual A, Sánchez J, Torres A *Increasing mixed haematopoietic chimerism after BMT with total depletion of CD4+ and partial depletion of CD8+ lymphocytes is associated of higher incidence of relapse* **Bone Marrow Transplantation** 1999, 23: 475-482
54. Roux E, Abdi K, Speiser D, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E, *Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with T-cell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse,* **Blood** 1993, 81(1): 243-248
55. Bader P, Hölle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Bend N, Schlegel PG, Niethammer D and Beck J *Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation—the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children* **Bone Marrow Transplantation** 1997, 19: 697-702
56. Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, Opalka B, Trenscher R, Seeber S, Schaefer UW, Beelen DW *A comparison of chimerism and minimal residual disease between four*

- 
- different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase* **Bone Marrow Transplantation** 2001, 27: 809-815
57. Pérez-Simón JA, Caballero D, Diez-Campello M, Lopez-Pérez R, Mateos G, Canizo C, Vazquez L, Vidriales B, Mateos MV, Gonzales M, San Miguel JF *Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation* **Leukemia** 2002, 16: 14232-1431
58. Kreiter S, Winkelmann N, Schneider PM, Schuler M, Fischer T, Ullman AJ, Huber C, Derigs HG, Kolbe K *Failure of sustained engraftment after non-myeloablative conditioning with low dose TBI and T-cell reduced allogeneic peripheral stem cell transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 2001, 28: 157-161
59. Pindolia K, Janakiraman N, Kasten-Sportes C, Demanet C, van Waeyenberge C, Pals G, Worsham MJ *Enhanced assessment of allogeneic bone marrow transplant engraftment using automated fluorescent-based typing* **Bone Marrow Transplantation** 1999, 24: 1235 – 1241
60. Nuckols JD, Rasheed BK, McGlennen RC, Bigner SH, Stenzel TT *Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit* **Am J Clin Pathol** 2002,113(1):135-140
61. Jolkowska J, Wachowiak J, Lange A, Kwissa M, Witt M *Molecular assessment of post-BMT chimerism using various biologic specimens and automated DNA sizing technology* **Hematother Stem Cell Res** 2000, 9(2): 263-268
62. Schraml E, Lion T *Interference of dye-associated fluorescence signals with quantitative analysis of chimerism by capillary electrophoresis* **Leukemia** 2003, 35: 146-150
63. Lion T *Summary: Reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection* **Leukemia** 2003, 17: 252-254
64. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ringden O, *T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation,* **Transplantation** 2001 71(3):433-9
65. Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, Preijers F, Hillegers M, Knops R, Pennings A, Boezeman J, Geurts van Kessel A, de Pauw B, de Witte T *Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation* **Leukemia** 2002, 16: 13-21
66. Wang L-J, Chou P, Gonzalez-Ryan L, Huang W, Haut PR, Kletzel M *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 Transplantation** 2002, 29: 51-56

- 
67. Lamb LS, Robbins NF, Abhyankar S, Joyce M, Stetler-Stevenson, Henslee-Downey PJ, Gee AP *Flow cytometric cell sorting combined with molecular chimerism analysis to detect minimal recurrent leukemia: good news and bad news* **Bone Marrow Transplantation** **1997, 19: 1157-1161**
68. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D and Klingebiel T *Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT* **Bone Marrow Transplantation** **1998, 21: 487-495**
69. Wäsch R, Reisser S, Hahn J, Bertz H, Engelhardt M, Kunzmann R, Veelken H, Holler E, Finke J *Rapid achievement of complete donor chimerism and low regimen-related toxicity after reduced conditioning with fludarabine, carmustine, melphalan and allogeneic transplantation* **Bone Marrow Transplantation** **2000, 26: 243-250**
70. Yamane A, Karasawa M, Maehara T, Tsukamoto N, Nojima Y *X-methylation-based chimerism assay for sex-mismatched hematopoietic stem cell transplantation* **Bone Marrow Transplantation** **2001, 28: 969-973**
71. Görner M, Kordelas L, Thalheimer M, Luft T, Pfeiffer S, Ustaoglu F, Punzel M, Weber-Nordt R, Moos M, Goldschmidt H, Ho AD *Stable mixed chimerism after T-cell depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using conditioning with low-dose total body irradiation and fludarabine* **Bone Marrow Transplantation** **2002, 29: 621-624**
72. Verdonck LF, Petersen EJ, Lokhorst HM, Nieuwenhuis HK, Dekker AW, Tilanus MGJ, de Weger RA *Donor leukocyte infusions for recurrent hematological malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: impact of infused and residual donor T cells* **Bone Marrow Transplantation** **1998, 22: 1057-1063**
73. Lion T, Daxberger H, Dubovsky J, Filipcik P, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Gadner H *Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation* **Leukemia** **2001, 15: 307-310**
74. Lawrer M *Commentary: Prospective chimerism analysis, the time is now but can we respond?* **Leukemia** **2001, 15: 1992-1994**
75. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation Chapter 13 Monitoring Outcome: MRD, chimerism and relapse* **The EBMT Handbook 2004 revised edition p. 199**
76. Pfaffl MW *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR* **Nucleic Acids Research** **2001, 29:2002-2007**
77. Dembińska-Kieć A, Naskalski JW *Diagnostyka Laboratoryjna z elementami biochemii*

- 
- klinicznej* **Wydanie II uzupełnione i poprawione Urban&Partner Wrocław 2002 1:998**
78. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L, Bayat G, Winiarski J, Ringden O, *Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia*, **Bone Marrow Transplant 2000, 25(8): 843-851**
79. Gardiner N, Lawrer M, O'Riodan JM, Duggan C, De Arce M and McCann SR *Monitoring of lineage-specific chimaerism allows early prediction of response following donor lymphocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukemia* **Bone Marrow Transplantation 1998, 21: 711-719**
80. Cimino G, Rapanotti MC, Ella L, Iori AP, Guglielmi C, Screnci M, Carmini D, De Felice L, Moleti ML, Mengarelli A, Mandelli F, Arcese W *A prospective molecular study of chimaerism in patients with haematological malignancies receiving unrelated cord blood or bone marrow transplants: detection of mixed chimaerism predicts graft failure with or without early autologous reconstitution in cord blood recipients* **British Journal of Haematology 1999 104 770-777**
81. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Rindg n O *Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation* **Leukemia 2001, 15: 1976-1985**
82. Balana-Nowak A, Zdziłowska E, Szostek M, Skotnicki AB *Ocena materiału przeszczepowego w oparciu o immunofenotyp hemopoetycznych kom rek macierzystych i progenitorowych oraz ich zdolno ci klonogenne w hodowlach in vitro* **Przegląd Lekarski 1999, 56 supplement 28:33**
83. Chen YH, Huang XJ, Xu LP, Liu DH, Chen H, Zhang YC, Han W, Gao ZY, Wu T, Zhang XH, Lu DP *A comparative study of peripheral blood stem cell vs bone marrow transplantation from unrelated donors* **Zhonghua Nei Ke Za Zh 2006, 45:624-627**
84. Martinelli G, Trabetti E, Frabegoli P, Testoni N, Bandini G, Motta MR, Vittone A, Terragan C, Pignatti PF, Tura S *Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hypervariable DNA regions* **Haematologica 1997, 82(2):156-160**
85. Frankel W, Chan A, Corringham RE, Shepherd S, Rearden A, Wang-Rodriguez J *Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic transplantation by short tandem repeats* **American Journal of Hematology 1996, 52(4): 281-287**
86. O'Reilly J, Meyer B, Stoner M, Erber W, Herrmann R, Davies J *Very early analysis of graft establishment after allogeneic bone marrow transplantation using the polymerase chain reaction* **British Journal of Haematology 1993, 85(1):169-172**
87. Savage WJ, Bleesing JJH, Douek D, Brown MR, Linton GM, Melech HL, Horwitz ME

---

*Lymphocyte reconstitution following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation follows two patterns depending on age and donor/recipient chimerism* **Bone Marrow Transplantation** 2001, 28: 463-471

88. Elmaagacli AH, Beelen DW, Schaefer UW *A retrospective single centre study of the outcome of five different therapy approaches in 48 patients with relapse of chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 1997, 20: 1045-1055
89. van Deerlin VM, Leonard DG *Bone marrow engraftment analysis after allogeneic bone marrow transplantation* **Clin Lab Med** 2000, 20(1):197-225
90. Mohty M, Faucher C, Vey N, Stoppa AM, Viret F, Chabbert I, Chabannon, Bouabdallah, R, Ladaïque P, Collet L, Zandotti C, Maraninchi D, Blaise D *High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 2000, 26: 251-255
91. Wu CJ, Hochberg EP, Rogers SA, Kutok JL, Biernacki M, Nascimento AF, Marks P, Bridges K, Ritz J *Molecular assessment of erythroid lineage chimerism following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation* **Experimental Hematology** 2003, 31:924-933
92. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelluci E, Persini B, Agostinelli F, Donati M, Manna M *Long-term survival of ex-thalasemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation* **Bone Marrow Transplantation** 2000, 25: 401-404
93. Lawrer M, McCann SR, Gluckman E, Hinterberger W, Hows J, Ljungman P, Marin P, Nissen C, Van't Veer Kerthof E, Raghavashar A, Socie G, Frickhofen N, Locasciulli A, Schrezenmeier H, Bacigalupo A *Mixed chimerism following BMT for SAA - value in prognosis* 1993 19<sup>th</sup> Meeting of the EBMT Garmisch-Partenkirchen
94. Acquaviva C, Duval M, Mirebeau D, Bertin R, Cave H *Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris – Robert Debre experience* **Leukemia** 2003, 17: 241-246
95. Baurmann H, Nagel S, Binder T, Neubauer A, Siegert W and Huhn D, *Kinetics of the graft-versus-leukemia response after donor leukocyte infusion for relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation*, **Blood**, 1998, 92(10): 3582-3590
96. Spitzer TR *Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant strategies and the role of mixed chimerism* **Oncologist** 2000, 5:215-223
97. Keil H, Haas OA, Fritsch G, Kalhs P, Lechner K, Mannhalter Ch, Reiter E, Niederwieser

- 
- D, Hoecker P and Greinix HT, *Donor leukocyte infusion for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia*, **Blood** **1997**, **89(9): 3113-3117**
98. Sen-Majumdar A, Sheehan K, Guo G, Allegre G, Simone J, Harvey M, Chow P, Moen R, Smith A *A comparative study on the efficacy of CD8-positive cells in enhancing allogeneic bone marrow engraftment: cell sorting vs microbead selection* **Bone Marrow Transplantation** **1998**, **22: 477-484**
99. Serrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C, Gonzalez MG, Reina L, del Carmen Rodriguez M, Alvarez MA, Maldonado J and Torres A, *Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210<sup>BCR-ABL</sup> and p190<sup>BCR-ABL</sup> after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190<sup>BCR-ABL</sup> detection precede cytogenetic relapse*, **Blood** **2000**, **95: 2659-2665**
100. Jakóbsiak M *Immunologia Warszawa 1996 Wydanie II zmienione Wydawnictwo Naukowe PWN* **1:694**
101. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R *Mini-allografts: ongoing trials in humans* **Bone Marrow Transplantation** **2000**, **25: 345-350**
102. de Weger RA; Tilanus MG, Scheidel KC, van den Tweel JG, Verdonck LF *Monitoring of residual disease and guided donor leukocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimerism analysis with short tandem repeats* **British Journal of Haematology** **2000**, **110(3): 647-653**
103. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Rovira M, Martinez C, Talam C, Jimenez M, Carreras E, Montserrat E *Low-dose total-body irradiation and transplantation from HLA-identical sibling donors do not induce complete T-cell donor engraftment in most patients with progressive hematologic diseases* **Experimental Hematology** **2003**, **31: 934-940**
104. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kühne T, Favre G, Grawohl A *Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation* **Leukemia** **2004**: **1 – 4**
105. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF *Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single centre experience of 12 children* **Leukemia** **1999**: **13: 2079-2086**
106. Mattsson J, Uzunel M, Remberger M, Ljungman P, Kimby E, Ringden O, Zetterquist H. *Minimal residual disease is common after allogeneic stem cell transplantation in patients*

- 
- with B cell chronic lymphocytic leukemia and may be controlled by graft-versus-host disease, **Leukemia 2000 14(2):247-254***
107. Socie G, Cayuela JM, Raynal B, Esperou H, Fund X, Raffoux C, Devergie A, Ribaud P, Marroveau JP, Parquet N, Sigaux F, Brison O, Gluckman E *Influence of CD34 cell selection on the incidence of mixed chimerism and minimal residual disease after allogeneic unrelated donor transplantation **Leukemia 1998, 12: 1440-1446***
108. Formánková R, Honzátková L, Sieglová Z, Stary J, Sedláček P, Brdička R *Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia **Bone Marrow Transplantation 2000, 25: 431-456***
109. Hancock J, Burgess M, Goulden N, Ferris V, Steward C, Potter M, Oakhill A *Prediction of relapse following unrelated BMT for childhood acute lymphoblastic leukemia by serial analysis of early chimerism **Blood 1996, 88: 268a***
110. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, Read EJ, Carter C, Bahceci E, Young NS, Barrett AJ, *Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. **Blood 1999, 94(9): 3234-3241***
111. Storb R *Mixed allogeneic chimerism and graft versus leukemia effects in acute myeloid leukemia **Leukemia 2002, 16: 753-754***
112. Amrolia PJ, Rao K, Slater O, Ramsay A, Veys PA and Webb DKH *Fatal graft-versus-host disease following HLA-mismatched donor lymphocyte infusion **Bone Marrow Transplantation 2001, 28: 623-625***
113. Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M *Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells **Blood 2002, 100(5): 1903-190***
114. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen presenting cells **Science 1999, 285:412-415***
115. Wu BY, Guo KY, Song CY, Yang DA Li D *Mixed chimera converted into full donor chimera with powerful graft-versus-leukemia effects but no graft-versus-host disease after non T cell-depleted HLA mismatched peripheral blood stem cell transplantation **Bone Marrow Transplantation 2000, 26: 691-693***
116. Matthes-Martin S, Mann G, Peters C, Lion T, Fritsch G, Haas OA, Potschger U, Gadner H *Allogeneic bone marrow transplantation for juvenile myelomonocytic leukaemia: a single centre experience and review of the literature **Bone Marrow Transplantation 2000, 26: 377-382***

---

117. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R *Mini-allografts: ongoing trials in humans* **Bone Marrow Transplantation** 2000, 25:345-350