مقاله اصیل

تعیین سریع کایمریسم با استفاده از مارکرهای جنسی آمیلوژنین در گیرندگان پیوند مغز استخوان از دهندگان غیر هم‌جنس

بهرام چهاردولی .M.Sc، حمیدالله غفاری .Ph.D*، کامران علی مقدم .M.D، اردشیر قوام زاده .M.D
دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات هماتولوژی-آنکولوژی و پیوند مغز استخوان

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۴، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات هماتولوژی-آنکولوژی و پیوند مغز استخوان
پست الکترونیک: Email: shghaffari2000@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۱۵

هدف: ارزیابی کاربرد ژن آمیلوژنین به منظور سنجش کایمریسم در نمونه‌های خون محیطی و یا مغز استخوان بیمارانی که از دهنده‌های غیرهم‌جنس پیوند دریافت کرده‌اند

مواد و روش‌ها: در این مطالعه روش کار PCR مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای آمیلوژنین، PCR بر روی DNA استخراج شده از سلول‌های سفید خون محیطی و یا مغز استخوان و در بعضی موارد بر روی زیر گروه‌های سلولی مانند سلول‌های T وگرانولوسیت‌ای جدا شده از بیماران دریافت کننده پیوند انجام شد. تعداد ۱۸ بیمار مبتلا به انواع مختلف لوکمی و ۱۲ بیمار با اختلالات هماتولوژیکی غیربدخیم که تحت پیوند سلول‌های پایه قرار گرفته بودند، توسط مارکرهای آمیلوژنین ارزیابی شدند.

یافته‌ها: تکثیر PCR این ژن شامل یک باند ۱۰۶ جفت باز بر روی کروموزوم‌های X در زنان و دو باند ۱۰۶و ۱۱۲ جفت باز به ترتیب بر روی کروموزوم‌های X و Y در مردان است. نسبت قطعات X/Y آنالیز شده در افراد گیرنده مغز استخوان توسط برنامه نرم افزاری دانسیتومتری به عنوان درصد کایمریسم گزارش شد. قدرت تشخیص آزمایش بین ۱ تا ۲ درصد تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: مزایای این روش استفاده از یک جفت پرایمر جهت تکثیر هر دو کروموزوم X و Y است. سنجش بر اساس PCR یا استفاده از ژن آمیلوژنین حساس است و به نمونه دهنده وگیرنده قبل از پیوند نیاز نیست. این آزمایش می‌تواند به طور روتین به صورت تنها و یا در کنار مارکرهای STR برای آنالیز نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی پیوندهای آلوژن نامتجانس برای تعیین اولیه برقراری یا رد پیوند و مشاهده کنیتیک‌های پیوند استفاده شود.

کلیدواژگان: مارکر آمیلوژنین، کایمریسم، پیوند مغز استخوان

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۶-۱

مقدمه

در حال حاضر پیوند سلول‌های پایه مغز استخوان یا خون محیطی آلوژنیک تنها راه درمانی برای بسیاری از بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم هماتولوژیکی است (۱). کنترل وضعیت سلول‌های دهنده، وضعیت کایمریسم، بعد از پیوند سلول‌های پایه برای تشخیص اولیه نارسایی پیوند یا عود بیماری دارای اهمیت است (۲). مارکرهای ژنتیکی که اجازه تمایز بین سلول‌های دهنده و گیرنده را بر اساس اختلافات آللیک ما بین دو جمعیت سلولی می‌دهند ابزار مهمی برای تعیین کایمریسم هماتوپویتیک بعد از پیوند سلول‌های پایه و یا تزریق سلول‌های دهنده هستند (۱). چندین تکنیک برای تعیین وضعیت کایمریسم بعد از پیوند مغز استخوان در دسترس است. مارکرهای (Short Tandem Repeats: STR) و (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR) برای نشان دادن وضعیت کایمریسم بعد از پیوند استفاده می‌شوند (۳، ۴).

استفاده از این مارکرها همیشه قابل استفاده نیست به علت اینکه در استفاده از این مارکرها الگوهای دهنده و گیرنده پیوند قبل از پیوند مغز استخوان مورد نیاز است. یک روش برای حل این مشکل تعیین جنسیت هر دو سلول مذکر و مونث در مخلوط سلولی بیماران بعد پیوندهای مغز استخوا ن از دهنده غیرهم‌جنس است. در مواقع پیوندهای غیرهم‌جنس اطلاعات نسبی سلول‌های دهنده و گیرنده می‌تواند به صورت موثر و سریع با استفاده از تکنیک‌هایی از قبیل FISH با پروب‌های اختصاصی برای کروموزوم های X و Y (۵، ۶) و یا با استفاده از روش PCR با پرایمر های اختصاصی بر ای یک ژن که روی کروموزوم‌های X و Y وجود دارند به دست آید (۷).در روش‌های جدیدتر از روش‌های کمی با استفاده از پرایمرهای فلورسنتی (۸) و یا روش‌های بر اساس Real Time PCR استفاده می‌شود (۹).

در انسان‌ها ژن آمیلوژنین بر روی هر دو کروموزوم X و Y وجود دارد. از این رو سایزهای مختلفی بر روی این کروموزوم‌ها برای این ژن وجود دارد که در پزشکی قانونی و تشخیص جنسی قبل از تولد استفاده شده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی به‌کارگیری ژن آمیلوژنین برای تخمین کایمریسم در نمونه‌های خون محیطی و مغز استخوان بیمارانی که پیوند را از دهندگان غیرهم‌جنس دریافت کرده‌اند است.

مواد و روش‌ها

بیماران

در مطالعه اولیه تعداد ۳۰ بیمار که تحت پیوند آلوژنیک غیرهم‌جنس در مرکز خون انکولوژی بیمارستان شریعتی قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار نمونه خون محیطی این بیماران قبل و بعد از پیوند و نیز دهندگان آنها جمع‌آوری شد.

DNA

DNA استخراج شده از لکوسیت‌های خون محیطی یا زیر گروه‌های این سلول‌ها از دهنده و گیرنده قبل و بعد از پیوند آنالیز شدند. لکوسیت‌های خون محیطی تا ۶ ماه بعد از پیوند جمع‌آوری شدند.

بعد از تزریق لنفوسیت‌های دهنده (DLI) نیز لکوسیت‌های خون محیطی هر ماه برای تعیین وضعیت کایمریسم جمع‌آوری شدند. سلول‌های تک هسته‌ای و چندهسته‌ای توسط گرادیانت غلظتی محلول فایکول جداسازی می‌شدند و DNA با روش نمک اشباع و پروتییناز K استخراج شد (۱۰) و در نهایت غلظت DNA توسط نور UV اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۶۰ اندازه‌گیری شد.

Multiplex PCR

یکی از روش‌های تغییر یافته PCR معمولی، روش مالتیپلکس PCR است. در این روش از چندین جفت پرایمر اختصاصی استفاده می‌شود. باید دقت شود شرایط دمایی پرایمرها یکسان، وطول قطعات به دست آمده به راحتی از یکدیگر قابل تفکیک باشد. ارزیابی کردن چند لکوس به طور هم‌زمان برای بالا بردن سرعت کار جهت پیدا کردن هتروزیگوسیتی علت کاربرد این تکنیک است.

در این قسمت از مارکرهای STR شامل ۹ مارکر STR (D7S820، VWA، CSF1PO، TPOX، D13S317، TH01، D16S539، D4S366 و CSF1PO)در کنار مارکر آمیلوژنین به صورت ۲ تا ۴ لکوس (بیشتر تریپلکس) در داخل یک تیوب و به صورت مالتیپلکس انجام می‌شد (۱۱).

سنجش آمیلوژنین

تکثیر ژن آمیلوژنین تعیین هم‌زمان سلول‌های مذکر و مونث را توسط یک واکنش PCR مقدور می‌سازد. محصول PCR سلول‌های مونث یک باند ۱۰۶ جفت بازی بر روی کروموزوم X و سلول‌های مذکر دو باند ۱۰۶ و ۱۱۲ جفت بازی به ترتیب بر روی کروموزوم X و Y است. برای هر نمونه DNA روش PCR با استفاده از پرایمر مستقیم A و پرایمر معکوس B شامل:

A, 5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'

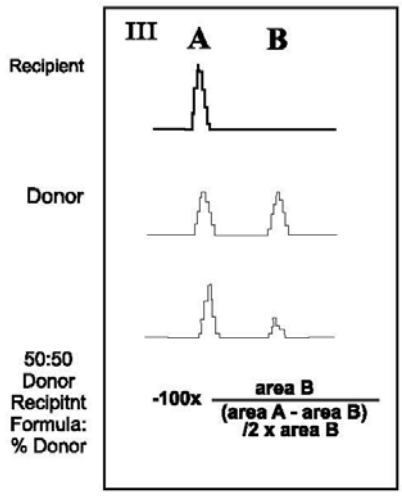
B, 5'-ATGAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'

انجام شد (۱۱).

حجم نهایی واکنش ۳۰ میکرولیتر، حاوی 1X بافر Taq polymarase، ۴ میلی‌مولار $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۳۰۰ نانومول از هر پرایمر و در نهایت به هر واکنش ۱ واحد آنزیم Taq polymarase و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی اضافه شد. تمام مواد مورد نیاز از شرکت سیناژن خریداری شد. PCR در ۳۰ سیکل انجام شد. هر سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۶۰درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک دناتوراسیون آغازی به مدت ۵ دقیقه تنظیم شده بود. جهت الکتروفورز و قابل رویت کردن محصولات PCR از ژل آگارز ۲درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیم برماید استفاده شد که برای این کار ۸ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر (loading buffer) استفاده شد. ژل در ولتاژ ۱۰۰ برای یک ساعت الکتروفورزمی‌شد و سپس تکثیر DNA توسط حضور باندی از سایز مناسب در هر واکنش PCR به جز کنترل منفی تایید می‌شد. در نهایت برای تفسیر باندها از ژل پلی‌اکریل آماید ۶درصد استفاده و باندهای DNA با روش رنگ‌آمیزی نقره قابل رویت می‌شدند.

محاسبه کایمریسم مخلوط

از باندهای ایجاد شده در ژل پلی‌اکریل‌آماید عکس‌برداری و با برنامه Quantity One و Multi-Aanalyst (Bio-Rad) آنالیز انجام شد. محاسبه درجه کایمریسم مخلوط بر این اساس است که محتوای حضور DNA در نمونه می‌تواند منعکس کننده سلول‌های مرتبط با دهنده و گیرنده باشد. نسبت سلول‌های دهنده و گیرنده با محاسبه نسبت حجم زیر نمودار در ارتباط با سیگنال‌های دهنده و گیرنده برای مارکر آمیلوژنین تعیین شدند (شکل ۱).



شکل ۱ : تصویری شماتیک از محاسبات انجام شده جهت ارزیابی کمی کایمریسم مخلوط. محاسبه کایمریسم مخلوط در مجموعه پیک‌های هتروزیگوت/هموزیگوت با یک آلل مشترک

یافته‌ها

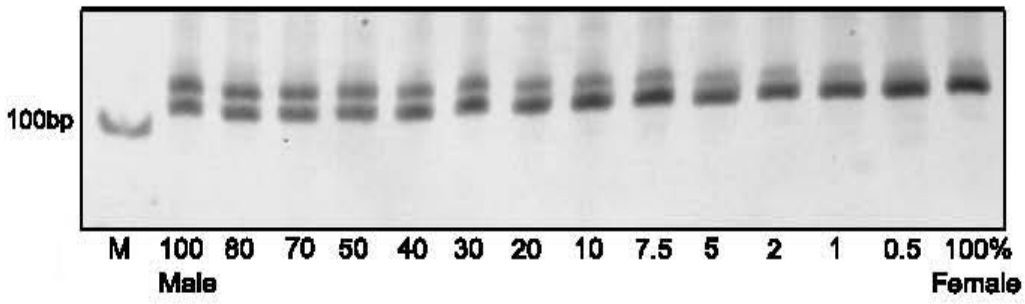
تکنیک PCR با استفاده از یک جفت پرایمر ژن آمیلوژنین بر روی نمونه‌های DNA سلول‌های سفید خون و یا نمونه‌های آسپیراسیون مغز استخوان، و در بعضی موارد روی زیرگروه سلول‌های T و گرانولوسیت‌های جدا شده از خون بیماران گیرنده پیوند انجام می‌شد. از آنجایی که ژن آمیلوژنین بر روی کروموزوم‌های X و Y قرار دارد انتظار می‌رود نمونه‌های بدست آمده از فرد مونث یک باند منفرد و نمونه‌های بدست آمده از افراد مذکر دو باند را به طور مساوی نشان دهند. شکل‌های ۲ الی ۵ مقایسه محصول PCR بدست آمده با پرایمرهای آمیلوژنین را نشان می‌دهند. سلول‌های مونث توسط یک باند در ناحیه ۱۰۶ جفت بازی برای کروموزوم X و سلول‌های مذکر توسط دو باند ۱۰۶ جفت بازی و ۱۱۲ جفت بازی به ترتیب برای کروموزوم‌های X و Y مشخص می‌شوند.

برای بدست آوردن قدرت تشخیص روش، سلول‌های سفید خون فرد مذکر را با سلول‌های سفیدخون فرد مونث به نسبت ۰/۵ تا ۸۰ درصد با غلظت ۵۰ نانوگرم DNA در هر واکنش PCR تکثیر داده شد. سپس با الکتروفورز ۲-۱ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریل آماید باندهای به دست آمده آنالیز شدند. قدرت تشخیص تکنیک به عنوان کمترین غلظت DNA که باند قابل رویت بر روی ژل رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره می‌داد تعیین شد (شکل ۲). آنالیز محصولات تکثیر شده قدرت تشخیص روش را بین ۱ تا ۲ درصد برای این مارکر نشان داد.

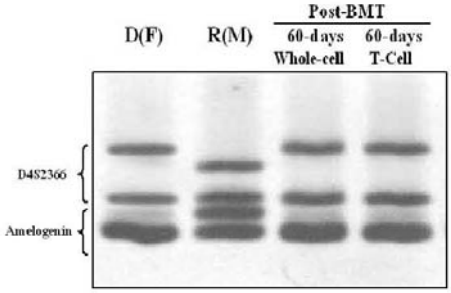
در این پژوهش ۱۸ بیمار که از انواع اختلالات لوکمی و ۱۲ بیمار دارای اختلالات هماتولوژیک غیربدخیم که تحت عمل پیوند مغز استخوان قرار گرفته بودند تحت کنترل دقیق مولکولی طی ۱ تا ۱۲ ماه بعد از پیوند قرار گرفتند. ۲۸ بیمار در رمیسیون کامل هماتولوژیکی بودند که با آنالیز مارکرآمیلوژنین کایمریسم کامل هماتوپویتیک را نشان دادند و دو بیمار کایمریسم مخلوط را نشان دادند و در نهایت پیوند را رد کردند.

طی مطالعه حاضر تلاش برای استفاده ازترکیب مارکرهای STR مختلف با مارکرهای آمیلوژنین صورت گرفت. حاصل این کار موفقیت در راه اندازی یک سنجش مالتیپلکس PCR شامل هر دو مارکرهای STR و آمیلوژنین بود که می‌تواند برای تعیین کایمریسم در بیماران پیوند شده استفاده شود. نتایج این تحقیق نشان داد که در سنجش‌های مالتیپلکس، مارکر STR می‌تواند در ترکیب با مارکر آمیلوژنین برای تعیین کایمریسم به کار رود. در شکل ۳ نمونه‌ای از برقراری پیوند در بیماری با کایمریسم کامل هماتوپویتیک دیده می‌شود. در این تصویر از دو مارکر آمیلوژنین و STR (مارکر D4S2366) استفاده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود دهنده (مونث) تک باند (باند X) برای مارکر آمیلوژنین و هتروزیگوت برای مارکر STR است و بیمار (مذکر) دارای دو باند (X,Y) برای مارکر آمیلوژنین و همچنین هتروزیگوت برای مارکر D4S2366 است که در یک آلل مشترک و در آلل دیگر متفاوتند.

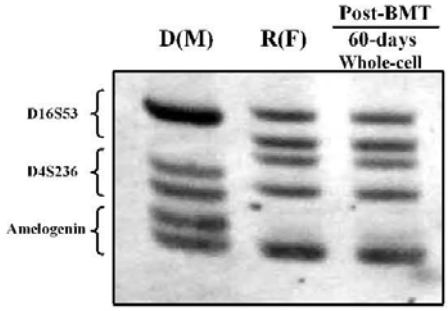
در این حالت الگوی باندها در فاصله ۶۰ روز بعداز پیوند بر روی خون کامل و سلول‌های T برقراری کامل پیوند را نشان می‌دهد (کایمریسم کامل)، در شکل ۴ نمونه‌ای از رد پیوند در بیمار مبتلا به ALL نشان داده شده است. همان‌طورکه ملاحظه می‌شود دهنده (مذکر) دارای دو باند (X,Y) و گیرنده تک باند (X) برای مارکر آمیلوژنین به صورت مالتیپلکس با دو مارکر STR (D4S2366 و D16S539) آورده شده است.



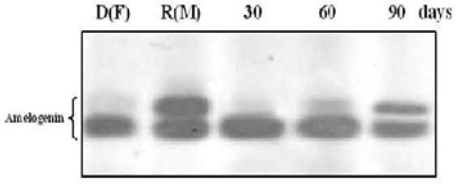
شکل ۲: نسبت کمی DNA فرد مونث و مذکر، قدرت تشخیص مارکر آمیلوژنین توسط مخلوط ساختگی سلول‌های دهنده (فرد مونث) و گیرنده پیوند (فرد مذکر) با یک پوشش جمعیتی از ۰/۵ درصد جمعیت کوچک تا ۸۰ درصد جمعیت بزرگ انجام شده است. قدرت تشخیص تکنیک به عنوان کمترین غلظت از DNA که باند قابل رویت بر روی ژل رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره می‌داد تعیین شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود قدرت تشخیص ۱ تا ۲درصد برای این مارکر بدست آمده است.



شکل۳: تشخیص نمونه‌ای از برقراری پیوند در یک بیمار CML با استفاده از مارکرهای آمیلوژنین و STR با روش مالتیپلکس PCR بر روی سلول‌های خون کامل و زیرگروه T-cell



شکل ۴: تشخیص نمونه‌ای از الگوی رد پیوند در یک بیمار ALL با استفاده از مارکرهای آمیلوژنین و STR با روش مالتیپلکس PCR بر روی سلول‌های خون کامل



شکل ۵: نمونه‌ای از عود بیماری در یک بیمار مبتلا به ALL. همان طور که مشاهده می‌شود بیماری منکر که پیوند مغز استخوان از خواهرش دریافت کرده است، در روز ۳۰+ بعداز پیوند الگوی کامل دهنده پیوند را نشان می‌دهد و در روز ۶۰+ درصد بسیار کمی از سلول‌های خودی ظاهر شده و در روز ۹۰+ الگوی سلول‌های خود گیرنده پیوند در حال برگشت است.

در این حالت الگوی باندها در فاصله ۶۰ روز بعد از پیوند بر روی خون کامل، الگوی خود بیمار را که نشان از رد پیوند یا عود بیماری است نشان می‌دهد. در شکل ۵ نیز نمونه‌ای از عود بیماری در یک بیمار مبتلا به ALL آمده است: بیماری مذکر که پیوند مغز استخوان از خواهرش دریافت کرده است، در روز ۳۰+ بعداز پیوند الگوی کامل دهنده پیوند را نشان می‌دهد و در روز ۶۰+، درصد بسیار کمی از سلول‌های خودی ظاهر شده و در روز ۹۰+ الگوی خود گیرنده پیوند در حال برگشت است.

بحث

پیوند آلوژنیک با سلول‌های پایه خون‌ساز از دهنده‌های HLA مچ برادری یا خواهری در مرکز ما با موفقیت برای درمان بیماران مبتلا به بدخیمی‌های خونی استفاده می‌شود. کنترل سلول‌های دهنده خون‌ساز و ارزیابی کایمریسم بعد از پیوند آلوژنیک یک نیاز اساسی است و توسعه یک روش صحیح و حساس و سریع برای تایید وضعیت پیوند سلول‌های لنفوید و میلوید از بیماران پیوند شده در دستور کار این مرکز قرار دارد. از کارهای مهم ما می‌باشد. در بعضی موارد تعیین کایمریسم مخلوط می‌تواند حتی عود بیماری زمینه را پیشگویی کند. آنالیز لکوس‌های STR با استفاده از روش PCR یک روش انتخابی برای این منظور است. برای انجام این نوع آنالیز باید الگوی ژنوتیپ دهنده وگیرنده به دست آمده باشد تا بتوان با مقایسه تفاوت‌های آللی دهنده و گیرنده پی به وضعیت و موفقیت پیوند برد. در بعضی موارد یا نمونه بیمار قبل از پیوند در دسترس نیست و یا ژنوتیپ STR قبل از پیوند بیمار مشخص نیست. یک روش برای این مشکل تشخیص جنسیت سلول‌های مذکر و مونث در مخلوط سلولی بیماران بعد از پیوندهای غیرهم‌جنس است. در انسان ژن آمیلوژنین بر روی کروموزوم‌های X و Y وجود دارد و معمولا برای موارد تعیین جنسیت در پزشکی قانونی و تشخیص‌های قبل از تولد به کار می‌رود (۱۲). هنگامی که نمونه از بیماران مونث با مارکر آمیلوژنین آنالیز می‌شود بر روی نمودار اسکن شده از محصول PCR یک پیک (peak) به دست می‌آید در حالی که بیماران مذکر دو پیک را با نسبت یک به یک نشان می‌دهند (۷).

بنابراین میزان نسبی این پیک‌ها برای محاسبه میزان مخلوط سلول‌های دهنده و گیرنده در نمونه‌های خون محیطی بیماران استفاده می‌شود. از این رو کاربرد این سنجش می‌تواند نه تنها برای تعیین جنسیت به کار رود بلکه برای آنالیز کمی کایمریسم مخلوط و همچنین برای مشاهده کنتیک‌های پیوند استفاده شود. لازم به ذکر است در هنگام پیوند مغز استخوان از دهندگان غیرهم‌جنس جنسیت سلول‌های خونی تغییر و فرد XX به XY و بالعکس تغییرخواهد کرد.

در مطالعه حاضر تلاش‌ها در جهت کاربرد و قدرت تشخیص مارکر آمیلوژنین در موقعیت بالینی و در راستای ارزیابی کمی کایمریسم مخلوط بعد از پیوند سلول‌های پایه خون‌ساز صورت گرفته است. برای به وجود آوردن شرایط بالینی مختلف و دقت و حساسیت آزمایش PCR آمیلوژنین در ارزیابی کمی کایمریسم مخلوط، در بیماران پیوند شده غیرهم‌جنس، از مخلوط سلولی اشخاص مذکر و مونث، با پوشش طیف سلولی بین ۰/۵ تا ۸۰ درصد تهیه شد. در این آزمایش یک ارتباط خطی بین نسبت سلول‌های مخلوط شده و میزان

محاسبه شده دهنده و گیرنده بر طبق سطح پیک باندهای مرتبط به دست آمد. نمایش یک جمعیت کوچک سلولی ۱ تا ۲درصد نیز با تکرارپذیری در چندین آزمایش غیروابسته به دست آمد. هر مخلوط سلولی مذکر/مونث می‌تواند آنالیز شود. این آزمایش به ویژه در بررسی کنتیک بیماران (مذکر یا مونث) در حین مراحل برقراری یا رد پیوند و نیز در عود بیماری بیشتر می‌تواند اطلاع دهنده و مفید باشد (شکل ۵).

در دسترس بودن و ساده بودن سنجش و صحت ارزش نیمه کمی به دست آمده با مارکر آمیلوژنین از مزایایی است که در مقایسه با آنالیز مارکرهای STR به دست آمد. در تحقیقات دیگری که ما انجام داده‌ایم، سیستم تکثیری مالتیپلکس PCR برای لکوس‌های STR ارزیابی شدند. ۹ مارکر STR شامل VWA، CSF1PO، TPOX، D13S539، D4S366، D7S820 و CSF1PO برای سه سیستم تری‌پلکس جهت سرعت، صحت و آنالیز قابل اعتماد ترکیب شده است. به هر یک از سیستم‌های تری‌پلکس، یک جفت پرایمر آمیلوژنین اضافه شد. روش مالتیپلکس PCR با استفاده از مارکرهای STR و آمیلوژنین روی بیماران با دهنده‌های غیرهم‌جنس انجام شد. یک ارتباط قوی، در مقایسه PCR لکوس آمیلوژنین با نتایج لکوس‌های STR به دست آمد. در حقیقت، استفاده از مالتیپلکس PCR با مارکر STR و آمیلوژنین توانایی سنجش را بالا می‌برد.

امروزه، این آزمایش به طور روتین، به تنهایی یا در ترکیب با سیستم‌های مالتیپلکس PCR، در مرکز هماتولوژی-انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی برای کنترل پیوند و تعیین کایمریسم در بیماران پیوند شده استفاده می‌شود. از دی ماه ۱۳۸۱ تا کنون بیش از ۲۲۰۰ نمونه از ۶۵۰ بیمار پیوند شده با سیستم مالتیپلکس شرح داده شده آنالیز شده‌اند. ۵۱ درصد بیماران از دهنده‌های غیرهم‌جنس پیوند دریافت کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

در این ارزیابی نتایج بدست آمده در بیشتر موارد فاقد نتایج مثبت کاذب یا منفی کاذب بوده است. به طوری که نتایج بالینی تایید کننده این وضعیت است. در ۵ درصد از موارد، هیچ نمونه قبل پیوندی از بیمار و یا دهنده وجود نداشت. لذا به کار بردن مارکر آمیلوژنین در این سنجش‌ها برای تصمیم گیری‌های درمانی پزشک‌های معالج دارای اهمیت بوده است.

تلاش ما بهره مندی از یک روش PCR برای ارزیابی کایمریسم با استفاده از لکوس‌های آمیلوژنین برای تعیین سریع کایمریسم روی بیمارانی که پیوند را از دهنده غیرهم‌جنس دریافت کرده‌اند، بوده است.

نتایج نشان داد استفاده از مارکر آمیلوژنین اجازه یک بررسی کمی سریع، قابل تکرار و صحیح از کایمریسم مخلوط را می‌دهد. مقایسه سنجش بدست آمده از آنالیز PCR مارکر آمیلوژنین در بیماران پیوند شده از دهنده‌های غیرهم‌جنس یک ارتباط عالی با نتایج STR-PCR را نشان داد. در نهایت کاربرد مارکر آمیلوژنین به تنهایی یا در ترکیب با سیستم STR می‌تواند جهت آنالیزهای کمی نسبی کایمریسم مخلوط و مشاهده کنتیک پیوند در بیمارانی که پیوند غیرهم‌جنس را دریافت کرده‌اند استفاده شود.

References

1. Thomas ED. Bone marrow transplantation: A review. Semin Hematol 1999; 36: 95-103

2. Thiede C, Florek, Bornha M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubaur A. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem markers and fluorescence detection. Bone Marrow Transplantation, 1999; 23, 1055-106

3. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt 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 of the international bone marrow transplant registry and the American society of blood and marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7: 473-485

4. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubouer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogenneic blood stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. Leukemia 2001; 15; 293-302

5. Wessman M, Ruutu T, Volin L, Knuutila S. In situ hybridization using a Y-specific probe-a sensitive method for distinguishing residual male recipient cells from female donor cells in bone marrow transplation. Bone Marrow Transplant 1989; 4; 283-286

6. Dumam DM, Anders KR, Fisher L. Analysis of origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. Blood 1989; 74; 2220-2226

7. Pugatsch T, Oppenheim A, Slavin S. Improved single-step PCR assay for identification post allogeneic sex-mismatched BMT. Bone Marrow Transplantation, 1996;

17, 273-275
8. Vincenzo Cirigliano, Jon Sherlock, Gerard Conway, Claire Quilter, Charles Rodeck, Matteo Adinolfi. Rapid Detection of Chromosomes X and Y Aneuploidies by Quantitative Fluorescent PCR .Prenat. Diagn. 1999; 19: 1099-1103
9. Jimenez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, Navarro G, Buno I, Castillejo JA, Rodriguez AL, Garcia-Gemar G. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/ deletion polymorphisms Leukemia 2005; 19: 336-343
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple saltingout procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215
11. Short Tandem Repeat DNAInternet DataBase. www.Cstl.nist.gov/div831/strbase
12. Nakahori Y, Takenaka O, Nakagoma Y. A human X-Y homologous region encodes amelogenin. Genomics 1991; 9(2): 264-269