

## Mikrochimérismus – na hraně počínajícího relapsu AML?

Horký O., Mayer J., Kablásková L., Borský M., Krejčí M., Dvořáková D.

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno

### Souhrn

Znovuobjevení či nárůst autologní krvetvorby po alogenní transplantaci hematopoetických buněk bývá spojen s počínajícím relapsem akutní myeloidní leukemie, nicméně význam mikrochimérismu (podílu autologních buněk pod hranicí 1 %) není jednoznačný. Byly porovnávány výsledky fragmentační analýzy (FA) a kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR). Hodnoty získané z obou analýz byly konfrontovány s klinickým stavem pacientů: kompletní remise, molekulární relaps, hematologický relaps. Zatímco RQ-PCR analýza periferní krve predikovala hematologický relaps ve 12 případech z 13 (92 %), s mediánem předpovědi 34 dnů (0–322 dní), byla FA úspěšná pouze v pěti případech (38 %) (medián předpovědi 0 dní, 0–154 dní) ( $p = 0,002$ ). RQ-PCR předcházela FA v 10 případech, s mediánem dřívější předpovědi 35 dní (interval 6–168 dní). RQ-PCR dále zachytila dalších 4 z 6 časných hematologických relapsů (do jednoho roku po transplantaci), mimo dosah senzitivity FA. Kombinace vyšetření periferní krve a kostní dřene navíc potvrdilo 9 molekulárních relapsů z 9. RQ-PCR se jeví jako citlivá a spolehlivá metoda stanovení mikrochimérismu, jehož dynamika umožňuje zachycení počátku relapsu a umožňuje tak časnou klinickou intervenci.

**Klíčová slova:** chimérismus, mikrochimérismus, relaps, AML, RQ-PCR

### Summary

Horký O., Mayer J., Kablásková L., Borský M., Krejčí M., Dvořáková D.: Microchimerism – on the edge of incipient AML relapse?

The reoccurrence or increase in autologous hematopoiesis after allogeneic stem cell transplantation has been linked with incipient leukemia relapse, however, importance of such emergency regarding microchimerism (chimerism under 1% of autologous cells) remains controversial. We compared conventional PCR of minisatellite, microsatellite, or sex specific regions followed by fragment analysis (FA) with real-time quantitative PCR (RQ-PCR) of insertion/deletion and sex polymorphism. Chimerism values obtained from both analyses were compared with the status of the disease (continuous complete remission, molecular relapse, hematological relapse, HR). Whereas RQ-PCR analysis of microchimerism predicted full HR in 12/13 cases (92%) with median of 34 days (0-322 days), the conventional FA was successful only in 5/13 cases (38%) (median 0 days, interval 0-154 days;  $p = 0.002$ ). RQ-PCR surpassed FA in 10 cases with median of earlier prediction of relapse of 35 days (interval 6-168 days). Besides this, RQ-PCR detected other 4/6 HR until one year after transplantation, beyond the sensitivity of FA. Further, RQ-PCR examination of peripheral blood in combination with bone marrow confirmed all 9 molecular relapses previously detected due to a specific molecular marker. We conclude, that RQ-PCR is sensitive and reliable method of microchimerism analysis that can predict impending relapse and allows therefore earlier clinical intervention in comparison with another, less sensitive method.

**Key words:** chimerism, microchimerism, relapse, AML, RQ-PCR

*Transfuzie Hematol. dnes, 15, 2009, No. 2, p. 97–102.*

## Úvod

Kvantitativní analýza chimérismu je důležitou součástí sledování pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloHSCT). Toto stanovení podílu dárcovské a přetrvávající vlastní krvetvorby podává nejprve informaci o uchycení a funkčnosti štěpu, jeho dynamika v čase pak pomáhá interpretovat klinický stav pacienta a je jedním z podkladů pro adekvátní léčbu, jež má úspěšnost transplantace podpořit (úprava imunosuprese, podání infuze dárcovských lymfocytů apod.) (1).

K nejčastějším příčinám selhání alloHSCT u akutních leukemií patří relaps onemocnění. Nebezpečí jeho počínajícího nástupu se určuje zpravidla na základě sledování minimální zbytkové choroby (minimal residual

disease, MRD), tato možnost je však omezena pouze na pacienty se specifickým molekulárním markerem (fúzní gen, genové mutace), jež u akutní myeloidní leukemie (AML) tvoří zhruba jen 60 % všech případů (2).

Diskuse o tom, zda také statut chimérismu s rizikem vzniku relapsu souvisí, či dokonce, zda může sloužit jako indikátor jeho nástupu, se začala rozvíjet v devadesátých letech minulého století. Zatímco někteří autoři mezi výskytem smíšeného chimérismu (SC; stav, kdy je současně detekována krvetvorba dárce i příjemce) a výskytem relapsu AML našli pozitivní korelaci (3–5), jiní tuto souvislost nepozorovali (6–13). Jednou z příčin těchto rozdílů je úhel pohledu na SC; zatímco znovuobjevení či nárůst autologní krvetvorby je spojen s počínajícím relapsem AML, klesající trend podílu vlastních buněk nikoliv (14–24).

Dalším zdrojem neshod, je aplikace různě citlivých metod stanovení chimérismu, a s tím spojená definice

kompletního dárcovského chimérismu (KC; stav, kdy je veškerá krvetvorba příjemce nahrazena krvetvorbou dárce). Za zlatý standard je v současné době považována amplifikace tandemových repetitivních (short tandem repeats – STR, případně variable number of tandem repeats – VNTR) a polymorfismů vázaných na pohlaví (např. amelogenin), s následnou kapilární elektroforézou s fluorescenční detekcí, tzv. fragmentační analýza (FA) (25–27). Mez detekce této metody se však pohybuje okolo 1 %, což pro včasné zachycení počínajícího relapsu nemusí být dostatečné. Naopak, ukazuje se, že aplikace metody s možností detekce mikrochimérismu (SC na hladině menší než 1 %), dokáže identifikovat počínající relaps ve větším počtu případů a dříve, než je tomu u méně citlivých metod (28–31).

V předkládané práci popisujeme význam detekce mikrochimérismu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-PCR) při predikci relapsu AML. Na základě dat od dlouhodobě sledovaných AML pacientů definujeme dynamiku mikrochimérismu, signalizující počínající hematologický relaps (HR) onemocnění a výsledky srovnáváme s výsledky FA.

## Pacienti

Z 31 AML pacientů, po alloHSCT sledovaných alespoň jeden rok, kteří podle výsledku FA dosáhli KC, byl informativní polymorfismus pro RQ-PCR nalezen u 28 z nich (90 %). Z tohoto souboru pacientů jich 11 prodělalo HR, 18 pacientů bylo dlouhodobě v kompletní remisi (CR) (jeden pacient zařazen do obou skupin). Jednalo se o dospělé pacienty (medián věku v době první alloHSCT 45 let, rozmezí 20–63 let), medián sledování byl 3 roky (interval 1–8 let).

Výsledky analýz dlouhodobě sledovaných pacientů byly aplikovány na časné HR (do jednoho roku po transplantaci) a molekulární relapsy (MR), všech AML pacientů, kteří po transplantaci dosáhli KC dle FA.

## Metody

### Izolace DNA a kvantifikace (mikro)chimérismu

DNA pro stanovení chimérismu ze vzorků periferní krve (PB), byla zpočátku izolována standardní vysolovací metodou (32), od roku 2003 pak přes kolony QIAamp Blood Mini Kit dle instrukcí výrobce (Qiagen).

Kromě počátečního období, kdy byla kvantifikace chimérismu prováděna denzitometricky přímo z agarózového gelu, byla FA prováděna pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí na přístroji ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Mez detekce se, podle typu použitého polymorfismu a postavení referenčních alel, pohybovala mezi 0,5 a 1,5 %.

Pro detekci mikrochimérismu jsme převzali metodu RQ-PCR, založenou na principu TaqMan<sup>®</sup> sond a využívající polymorfismus typu inserce/delece a marker vázaný na chromozom Y (29, 33). Amplifikační reakce probíhala na přístroji RotorGene-3000 (Corbett Research) a výpočet SC byl prováděn z obecného vzorce  $\Delta\Delta Ct$ . Jako kalibrátor byl použit vzorek DNA příjemce před transplantací, za referenční gen sloužil albumin. Maximální mez detekce RQ-PCR byla 0,01 %. Pro podrobný popis výše uvedených metod viz naše předchozí práce (27, 34).

### Izolace RNA a analýza MRD

U pacientů s definovanými molekulárními markery byla MRD detekována podle standardizovaných protokolů (35). Izolace RNA na její určení byla izolována pomocí komerčního kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen).

### Získávání buněčných subpopulací

Subpopulace buněk PB a kostní dřeně (BM) pro analýzu v liniích byly získány sortováním na přístroji FACS Vantage Flow Cytometer Cell Sorter (Beckton Dickinson).

### Statistické metody

Statistické porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno neparametrickými testy pro párové (Wilcoxonův párový test) respektive nepárové uspořádání (Mann-Whitneyův test).

## Výsledky

### Doba do dosažení KC

Porovnání metod FA a RQ-PCR potvrdilo opožděné dosažení KC po alloHSCT dle RQ-PCR vzhledem ke stanovení pomocí FA (270 vs. 76 dní;  $p < 0,001$ ). Naopak, mezi skupinou pacientů, kteří zrelabovali (HR) a skupinou pacientů v CR nebyl nalezen rozdíl (tab. 1).

### Dynamika mikrochimérismu před HR

Na základě retrospektivní analýzy vzorků PB předchá-

**Tab. 1.** Doba do dosažení KC po alloHSCT pomocí FA a RQ-PCR u relabujících (HR) a nerelabujících (CR) pacientů.

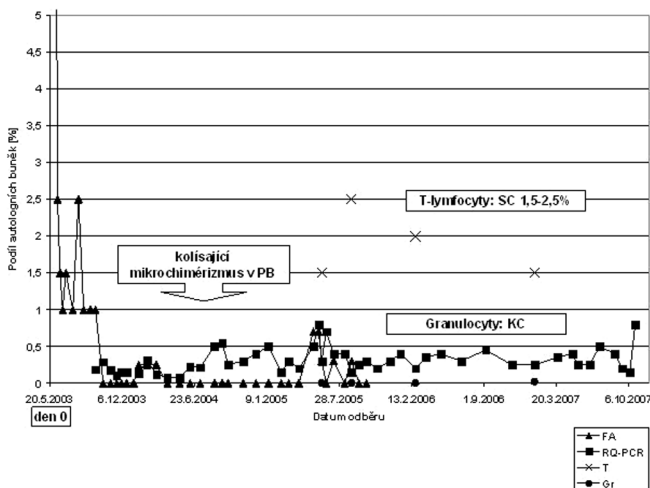
HR	Číslo pacienta	38	60(1)	76	105	133	145	125	138	176	213	217								
	dosažení KC	FA	504	168	14	42	79	21	215	188	49	29	245							
	[den po alloHSCT]	RQ-PCR	874	280	168	184	392	161	273	463	121	588	387							
CR	Číslo pacienta	34	40	48	60(2)	64	85	103	118	178	184	190	200	204	208	225	230	236	239	
	dosažení KC	FA	31	217	199	14	76	196	148	147	127	27	189	53	11	31	203	27	20	14
	[den po alloHSCT]	RQ-PCR	392	357	525	14	217	245	267	N*	587	513	N*	313	249	125	214	N*	69	203

Den dosažení KC byl stanoven podle prvního odběru klasifikovaným jako KC, potvrzený následujícím odběrem (rovněž KC). \*) N=KC nedosaženo.

**Tab. 2.** Dynamika chimérismu indikující hematologický relaps.

Chimérismus	Po sobě jdoucí odběry		
	1.	2.	3.
stabilní KC	znovuobjevení SC	nárůst (zpravidla o řád)	–
KC/SC <<0,1%	nárůst	nárůst o řád stejné	- nárůst o řád
SC ~ 0,1%	~0,1%	~0,1%	nárůst 3 až 5x

Zatímco u vzorků s výchozím KC stačí při nárůstu autologní krvinek k potvrzení HR jeden další odběr, u pacientů se SC je k potvrzení nastupujícího HR zpravidla třeba dalších dvou odběrů.



**Graf 1.** Přetrvávající mikrochimérismus (SC > 0,1 %) u pacienta v CR. Analýza v subpopulacích leukocytů odhalila, že přetrvávající autologní buňky pocházejí z T-lymfocytů

zejících HR, byla stanovena dynamika mikrochimérismu, indikující počínající HR onemocnění. Ukázalo se, že je nutno rozlišovat mezi pacienty se stabilním KC,

a pacienty s kolísajícím mikrochimérismem na hladině menší než 0,1 % (tab. 2): zatímco u vzorků se stabilním KC stačí při nárůstu autologní krvinek k potvrzení hrozícího HR jeden další odběr, u pacientů se SC je zapotřebí dalších dvou odběrů. U pacientů v CR byl, naopak tomu, podle času od transplantace, detekován a) SC s klesající tendencí (ve smyslu podílu autologních buněk), b) kolísající mikrochimérismus na hladině menší než 0,1 % (bez přesvědčivého nárůstu) nebo c) KC.

Pouze u dvou pacientů v CR byl dlouhodobě pozorován stabilní mikrochimérismus na hladině vyšší než 0,1 %. Analýza v jednotlivých subpopulacích leukocytů odhalila, že detekovaná autologní populace buněk pochází z T-lymfocytární řady (graf 1).

*Porovnání RQ-PCR a FA při predikci HR*

Výše definovaná dynamika mikrochimérismu predikovala HR v 12 případech z 13 (92 %), s mediánem předpovědi 34 dnů (interval 0–322 dnů). FA byla naproti tomu úspěšná pouze v 5 případech (38 %), se střední dobou předpovědi 0 dnů (interval 0–154 dnů; p = 0,002). Detekce HR pomocí RQ-PCR předcházela FA v 10 případech, s mediánem dřívější předpovědi 35 dní (6–168 dní) (tab. 3). (Příklad dřívější detekce HR viz graf 2).

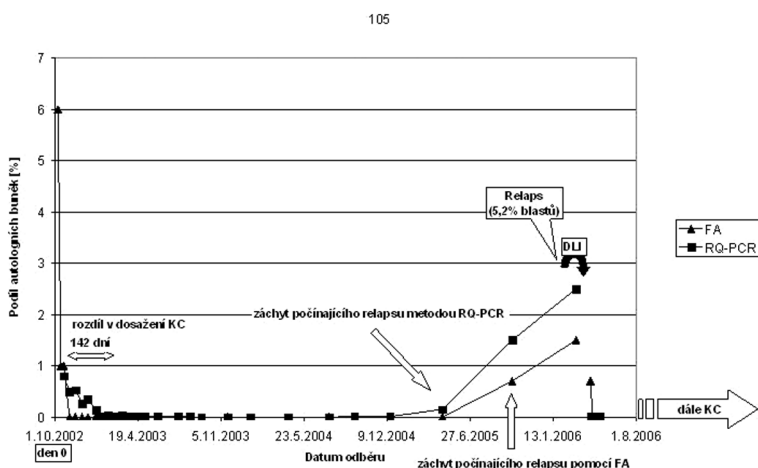
*Časné HR, molekulární relapsy a mikrochimérismus*

Analýza mikrochimérismu z PB predikovala 4 časné HR ze 6 (67 %), detekce MR byla možná v 5 případech z 9 (55 %). Rozpoznání MR však selhalo pouze v případech, kdy byl MR původně stanoven na základě sledování MRD BM nebo CD34+ buněk BM. Zpětné vyšetření mikrochimérismu ze stejného materiálu rovněž odhalilo signifikantní nárůst podílu vlastních buněk ve všech čtyřech zbývajících případech.

**Tab. 3.** Porovnání možnosti predikce HR stanovením (mikro)chimérismu pomocí RQ-PCR a FA.

Pacient [číslo]	Hematologický relaps (HR)		RQ-PCR		FA		Rozdíl mezi metodami [počet dní]
	Pořadí HR	stanovení HR* [den po alloHSCT]	záchyt HR** [den po alloHSCT]	predikce HR [počet dní]	záchyt HR*** [den po alloHSCT]	predikce HR [počet dní]	
38	I.	678	678	0	678	0	0
	II.	1120	1099	21	1099	21	0
60	I.	545	448	97	-	0	97
	II.	556	471	85	527	29	56
76	III.	1010	967	43	967	43	0
105	I.	1262	940	322	1108	154	168
125	II.	551	518	33	-	0	33
133	I.	686	651	35	686	0	35
138	I.	1128	1107	21	1115	13	8
145	I.	693	583	110	693	0	110
176	I.	1108	1094	14	1108	0	14
213	I.	442	436	6	442	0	6
217	I.	650	616	34	650	0	34
			medián	34		0	35

\* Stanovení HR – na základě počtu blastů v kostní dřeni (myelogram). \*\* RQ-PCR – záchyt HR podle výše definované dynamiky. \*\*\* FA – záchyt HR znovuobjevením SC. Predikce – o kolik dní předcházela záchyt HR pomocí RQ-PCR respektive FA určení HR dle myelogramu



Graf 2. Příklad porovnání FA a RQ-PCR. Opožděný nástup KC dle RQ-PCR a dřívější detekce relapsu

## Diskuse

Jedním z důvodů rozdílných výsledků posuzování vztahu chimérismu a rizika vzniku relapsu, je použití metod s různou mezí detekce. Vzhledem k možnostem dřívějšího klinického zásahu je ovšem senzitivita aplikované metody stanovení chimérismu důležitým aspektem a to zejména u onemocnění s rychlou progresí.

Přesto nebyl přínos analýzy mikrochimérismu hned zřejmý. Bader a kol. při aplikaci metody detekce chromozomu Y s citlivostí 0,1–0,01 % nepozorovali ve smyslu záchytu relapsů žádný posun ve srovnání s amplifikací VNTR regionů a hranici meze detekce kolem 1 % tudíž považovali za dostatečnou (5). Naproti tomu Suttorp a kol., metodou se senzitivitou kolem 1 %, nedetekovali u sedmi pacientů s akutní leukémií žádné autologní buňky ani krátce (30–86 dní) před HR (9). Podobný výsledek publikovali Choi a kol. (12), kteří zaznamenali relaps u 6 pacientů s KC, stanoveným do jednoho měsíce před následným HR (citlivost použité metody byla 0,5–2,5 %). Tyto výsledky svědčí o rychlém nástupu relapsu u akutních leukémií, který potvrzuje i aplikace citlivější metody stanovení chimérismu, metody RQ-PCR. Alizadeh a kol. zmiňuje případ pacientky transplantované pro AML, u níž došlo ke znovuobjevení autologní krevetvorby 112. den po transplantaci (0,1 %), s potvrzením den 151 (0,7 %), 19 dní před náhlým relapsem diagnostikovaným přítomností blastů v PB (29).

O rychlosti nástupu relapsu svědčí i práce porovnávající možnosti jeho predikce pomocí stanovení chimérismu metodami s různou senzitivitou. Jiménez-Velasco a kol. srovnávají VNTR-PCR a RQ-PCR u 61 pacientů s akutní leukémií; rostoucí podíl autologních buněk před relapsem byl metodou RQ-PCR zachycen u 88,2 % případů s mediánem předpovědi 58 dní, kdežto pomocí VNTR-PCR byl takový nárůst detekován pouze u 44,4 % pacientů (30). Podobně Koldehoff a kol. pozorovali znovuobjevení autologní krevetvorby před HR pomocí RQ-PCR signifikantně dříve než analýzou STR-PCR (120 vs. 30 dní,  $p < 0,007$ ) (31).

Naše práce porovnává RQ-PCR s FA, a to jak s využitím VNTR polymorfismů, tak s aplikací STR. RQ-PCR analýza v PB dokázala predikovat HR v 12 případech z 13 (92 %; medián předpovědi 34 dnů), kdežto FA pouze v pěti případech (38 %). Detekce HR pomocí RQ-PCR předcházela FA v 10 případech, se signifikantně vyšším mediánem dřívější předpovědi. Počínající relaps byl detekován jako znovuobjevení autologní krevetvorby či její relevantní nárůst, vždy s potvrzením nárůstu v následujícím odběru. Naproti tomu u pacientů v CR byl detekován (mikro)chimérismus s klesajícím podílem autologních buněk, mikrochimérismus na hladině menší než 0,1 % nebo, u pacientů delší dobu po aloHSCT, KC.

Použití citlivých metod stanovení chimérismu jako je RQ-PCR s sebou přináší skutečnost, že SC je po transplantaci detekován delší dobu. Podle očekávání došlo v našem souboru k dosažení KC po transplantaci signifikantně později podle RQ-PCR ve rovnání s FA. Naopak, mezi skupinou relabujících a nerelabujících pacientů v tomto ohledu rozdíl není, tudíž nelze dopředu vytipovat pacienty s vyšším rizikem relapsu. Analýza chimérismu v konkrétních buněčných liniích PB může v takových případech výrazně přispět k porozumění a mapování průběhu nemoci. U dvou našich pacientů v CR s dlouhodobě stabilním mikrochimérismem na hladině 0,1–0,8 % určení chimérismu v liniích odhalilo, že autologní buňky pocházejí z T-lymfocytární řady, tedy z linie, která nesouvisí s malignitou myeloidní leukémií. Naopak přetrvávající mikrochimérismus v granulocytech, monocytech nebo NK buňkách, nebývá spojen s příznivou prognózou (data neprezentována).

V některých případech HR se ukázalo, že detekovaný podíl pacientových buněk v PB je několikanásobně menší než počet blastů nalezených v BM. Sledování chimérismu v BM tedy zvyšuje pravděpodobnost záchytu relapsu. Toto podporují i data z literatury: např. Bader a kol. pozorovali u dvou AML pacientů ze sedmi v době relapsu KC v PB, avšak v BM zachytil až 40 % autologních buněk (5). Obdobně Wäsh a kol. u dvou AML pacientů v době relapsu v PB detekovali KC, kdežto v BM SC, a to navíc také u dalšího pacienta, který měl v PB pouze mikrochimérismus (14).

Důležitost monitorování chimérismu v BM navíc ukázaly i výsledky úspěšnosti sledování PB při záchytu časných HR a hlavně pak MR. V případě časných HR nedošlo ke znovuobjevení nebo signifikantnímu nárůstu autologní krevetvorby ve dvou případech ze šesti: v prvním se jednalo o mimodřeňový relaps, ve druhém případě nebyly blasty z BM vyplavovány do PB. Zachycení MR pomocí mikrochimérismu selhalo ve čtyřech případech z devíti a to pouze tehdy, došlo-li původně k určení MR na základě sledování MRD v BM. Zpětné vyšetření mikrochimérismu ve dřívějším nárůstu podílu autologní krevetvorby odhalilo.

## Závěr

Pro predikci relapsu je rozhodující dynamika mikrochimérismu, kdy opakovaně narůstá podíl autologních buněk. Naproti tomu u pacientů v CR nedetekujeme v PB autologní krvetvorbu vůbec nebo na hladině menší než 0,1 %. Výjimku tvoří pacienti, jejichž autologní buňky pocházejí pouze z T-lymfocytární řady.

RQ-PCR predikovala nastupující HR v 12 případech ze 13 (92 %), FA naproti tomu pouze v 5 případech (38 %) ( $p = 0,002$ ). RQ-PCR se při záchytu relapsu ukázala jako lepší v 10 případech, s mediánem dřívější předpovědi 35 dnů.

RQ-PCR v PB odhalila 4 časné HR (do jednoho roku po transplantaci) ze 6 a dalších 5 MR z 9. K selhání záchytu MR došlo pouze v případech, kdy byl MR onemocnění původně stanoven na základě MRD vyšetření vzorků BM, kde nárůst podílu autologních buněk odhalilo až dodatečné vyšetření mikrochimérismu.

RQ-PCR je spolehlivá metoda kvantifikace mikrochimérismu, umožňující včasné zachycení počínajícího relapsu AML. Na základě našich výsledků však doporučujeme testovat nejen PB, ale i BM. U pacientů s přetrvávajícím mikrochimérismem v PB, je vhodná i analýza v jednotlivých subpopulacích leukocytů.

*Práce byla částečně podpořena z Výzkumného záměru MŠMT ČR č. MSM0021622430*

## Literatura

- Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 107–119.
- Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 4–16.
- Lawler M, Humphries P, McCann S. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 77: 2504–2514.
- Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, et al. 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 Transplant* 1997; 19: 697–702.
- Bader P, Beck J, Frey A, et al. 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 Transplant* 1998; 21: 487–495.
- Schattenberg A, de Witte T, Salden M, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 1989; 73: 1367–1372.
- Roy DC, Tantravahi R, Murray C, et al. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood* 1990; 75: 296–304.
- Bertheas MF, Lafage M, Levy P, et al. Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 1991; 78: 3103–3106.
- Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Löffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 1993; 7: 679–687.
- van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JTh, Meera Khan P, Vossen JM. Mixed T-lymphoid chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies of children is not correlated with relapse. *Blood* 1993; 82: 1921–1928.
- van Leeuwen JEM, van Tol MJD, Joosten AM, et al. Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 1994; 83: 3059–3067.
- Choi SJ, Lee KH, Lee JH, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 327–332.
- Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, et al. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2002; 16: 13–21.
- Wäsch R, Bertz H, Kunzmann R, Finke J. Incidence of mixed chimerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2000; 109: 743–750.
- Formánková R, Honzátková L, Siegllová Z, Starý 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 Transplant* 2000; 25: 453–456.
- Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, et al. 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.
- Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, et al. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2002; 16: 13–21.
- Pérez-Simón JA, Caballero D, Diez-Campelo M, et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002; 16: 1423–1431.
- Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 801–810.
- Formánková R, Sedláček P, Kršková L, Říhová H, Šrámková L, Starý J. Chimerism-directed adoptive immunotherapy in prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. *Haematologica* 2003; 88: 117–118.
- Scheffold C, Kroeger M, Zuehlsdorf M, et al. Prediction of relapse of acute myeloid leukemia in allogeneic transplant recipients by marrow CD34+ donor cell chimerism analysis. *Leukemia* 2004; 18: 2048–2050.
- Lamba R, Abella E, Kukuruga D, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia* 2004; 18: 1681–1686.
- Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia* 2003; 17: 613–620.
- Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MGJ, Verdonck LF. Chimerism analysis within 6 month of allogeneic stem cell transplantation predict relapse in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 285–291.
- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473–485.

26. 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.
27. Horký O, Dvořáková D, Mayer J. Kvantitativní analýza chimerismu po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. *Trans Hematol* 2004; 10: 70–75.
28. Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 419–425.
29. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99: 4618–4625.
30. Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia* 2005; 19: 336–343.
31. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphism, standard tandem repeats, and Y chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006; 81: 735–746.
32. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215.
33. Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, et al. Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 558–566.
34. Horký O, Mayer J, Dvořáková D. Stanovení chimérismu pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Přehled a první vlastní zkušenosti. *Trans Hematol* 2007; 13: 73–78.
35. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17: 2318–2357.

*Mgr. Ondřej Horký*

*Centrum molekulární biologie a genové terapie*

*IHK, LF MU a FN Brno*

*Černopolní 9*

*613 00 Brno*

*e-mail: ohorky@fnbrno.cz*

*Doručeno do redakce: 7. 1. 2009*

*Přijato: 19. 2. 2009*

## Oznámení

Česká skupina pro Ph-myeloproliferativní onemocnění požádala výbor České hematologické společnosti ČHS JEP o přidělení oficiálního statutu pod její záštitou. Ustavující schůze se bude konat 24. 6. 2009 v Regionálním centru Olomouc v restauraci Grand Appetit ve 12.30 hod.

Za přípravný výbor  
MUDr. Jiří Schwarz, CSc.

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.