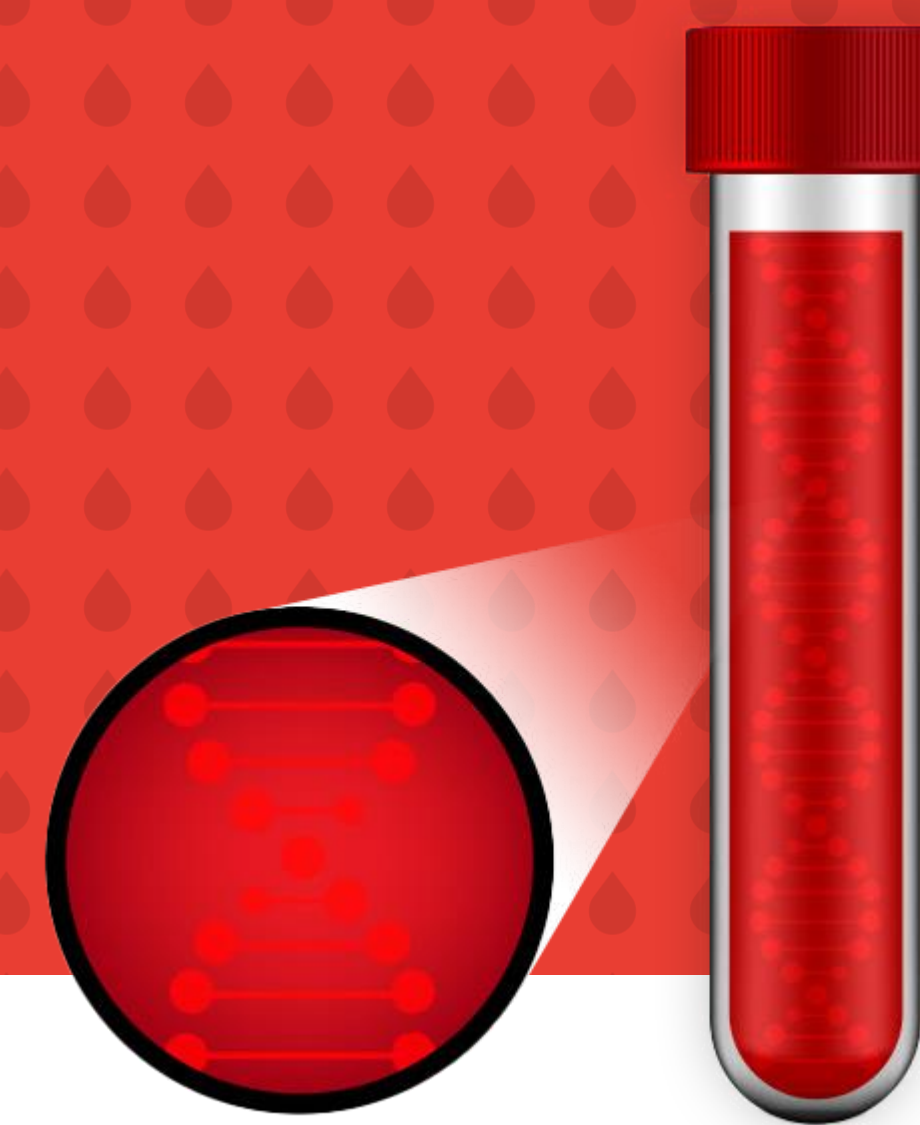


Vliv použité metody izolace DNA na výslednou kvantifikaci pro monitorování buněčného chimerismu

Josefusová, K., Stefflová, L., Čížková, B., Hrabáková, P., Přerovská, R., Leontovyčová, M., Staňková, M., Březinová, D., Čechová, H.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení HLA, Praha, Česká republika



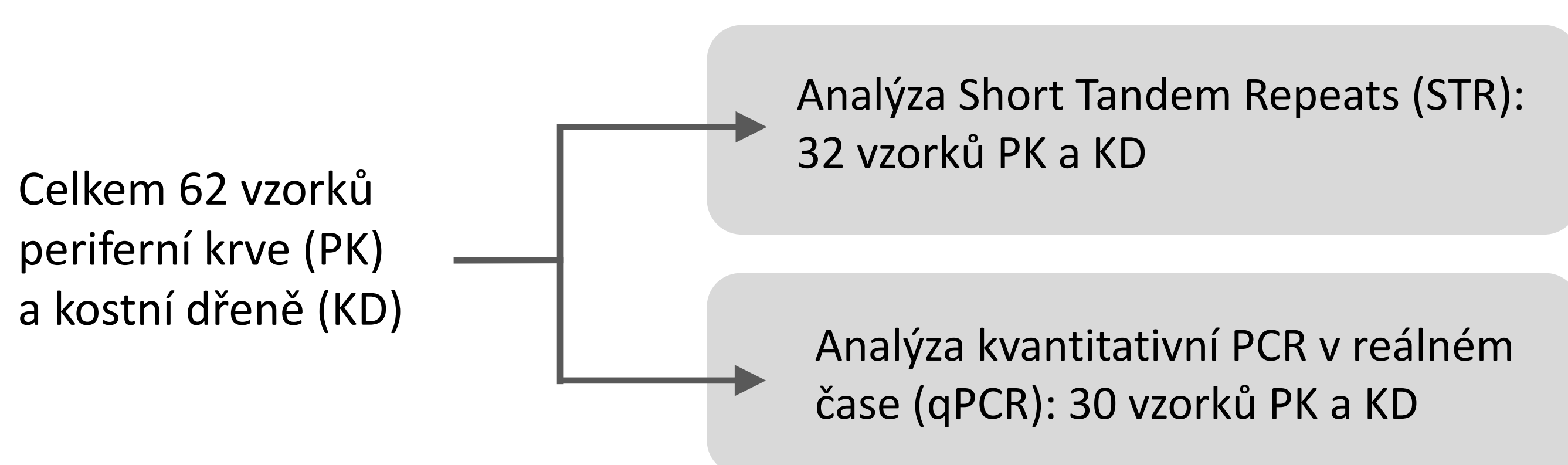
Úvod

Chimerismus je unikátní stav, kdy je v jednom organismu současně přítomno více buněčných populací, které se geneticky liší. Buněčný chimerismus nastává mimo jiné (po transplantaci některých orgánů nebo přechodně po krevní transfuzi) po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk.

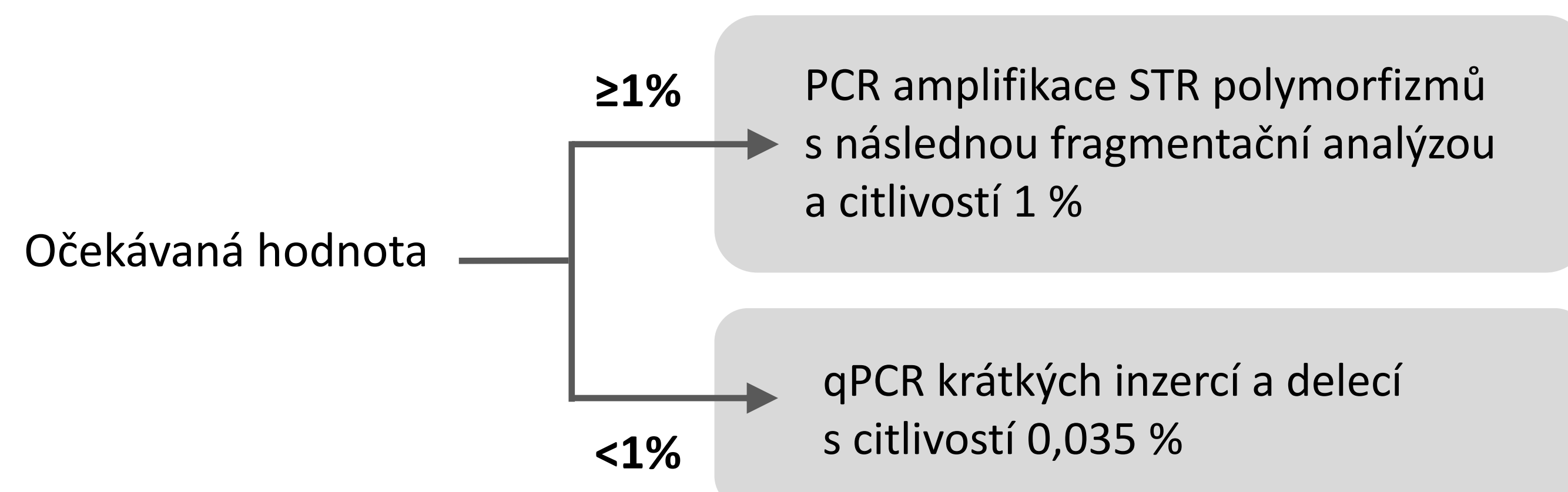
V laboratoři ÚHKT je buněčný chimerismus vyšetřován pro potřebu sledování pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Potransplantační monitoring buněčného chimerismu je vhodnou metodou pro sledování dynamiky přihojení štěpu, aktivity dárcovské krevetvorby, ale zejména je důležitý pro

detekci návratu autologní krevetvorby, která značí možné riziko relapsu nemoci. Pro kvantifikaci buněčného chimerismu jsou v současnosti využívány především molekulárně genetické metody vyžadující izolaci DNA. Metody izolace jsou klíčové pro kvantifikaci buněčného chimerismu.

Materiál

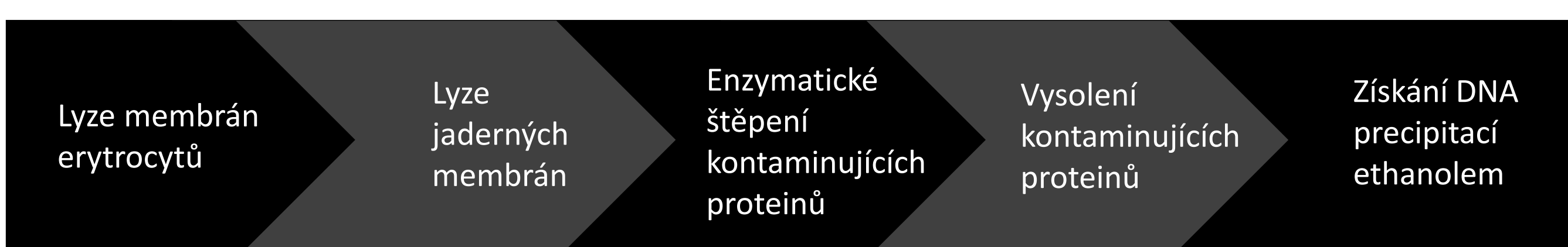


Metody kvantifikace buněčného chimerismu



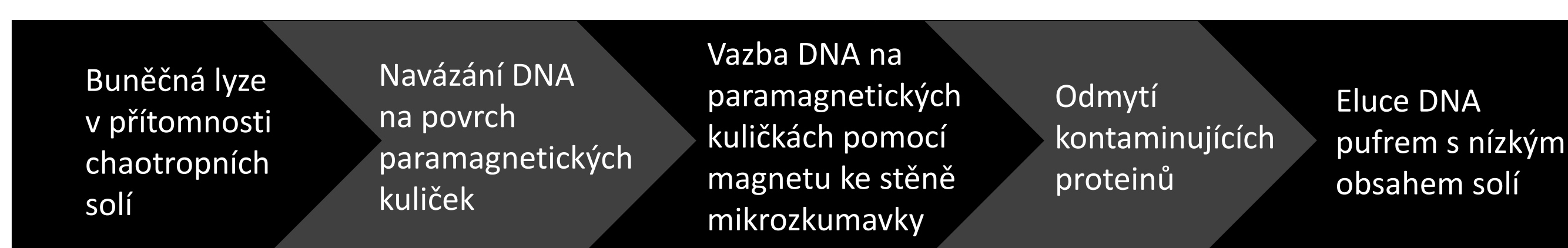
Metody izolace DNA

Vysolovací metoda dle Millera



- Pro izolaci DNA je zpracován celý objem odebraného primárního vzorku (obvykle 5 – 10 ml PK, 2 – 5 ml KD).
- Výhodou metody je vysoký výtěžek a kvalita získané DNA.
- Nevýhodou je časová náročnost.

Automatická izolace pomocí přístrojů typu MagCore (Super a Compact) za použití komerční cartridge



- Při této izolaci je použito 400 μ l vzorku.
- Výhodou metody je rychlost izolace. Z tohoto důvodu je preferována pro statimová vyšetření.
- Nevýhodou jsou nižší výtěžky získané DNA s nižším faktorem čistoty a nedostatečné odmytí reagensů (například degradovaných proteinů), které mohou inhibovat PCR.

Výsledky

Výsledky všech stanovení byly statisticky zpracovány neparametrickým Wilcoxonovým testem.

STR analýza

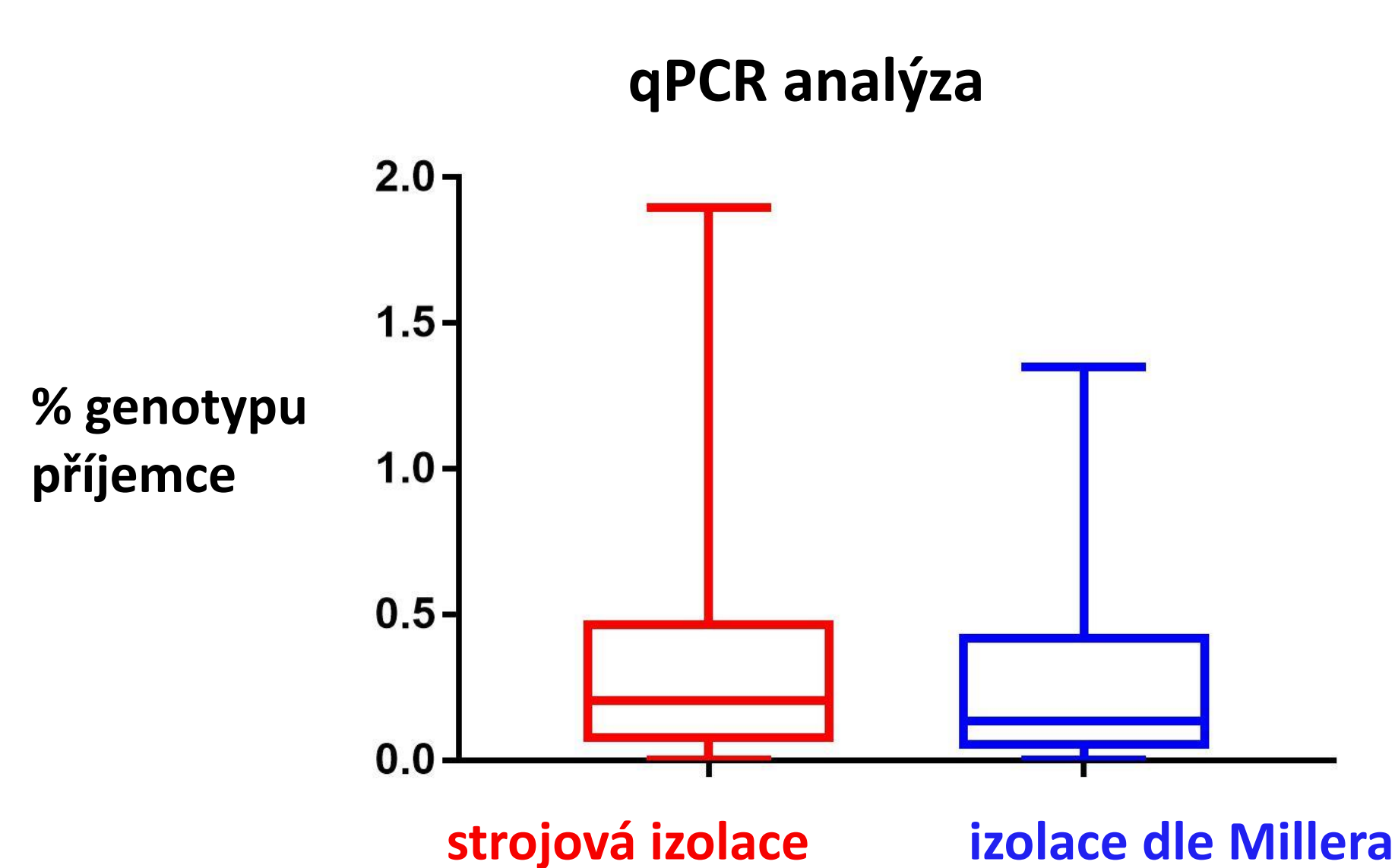
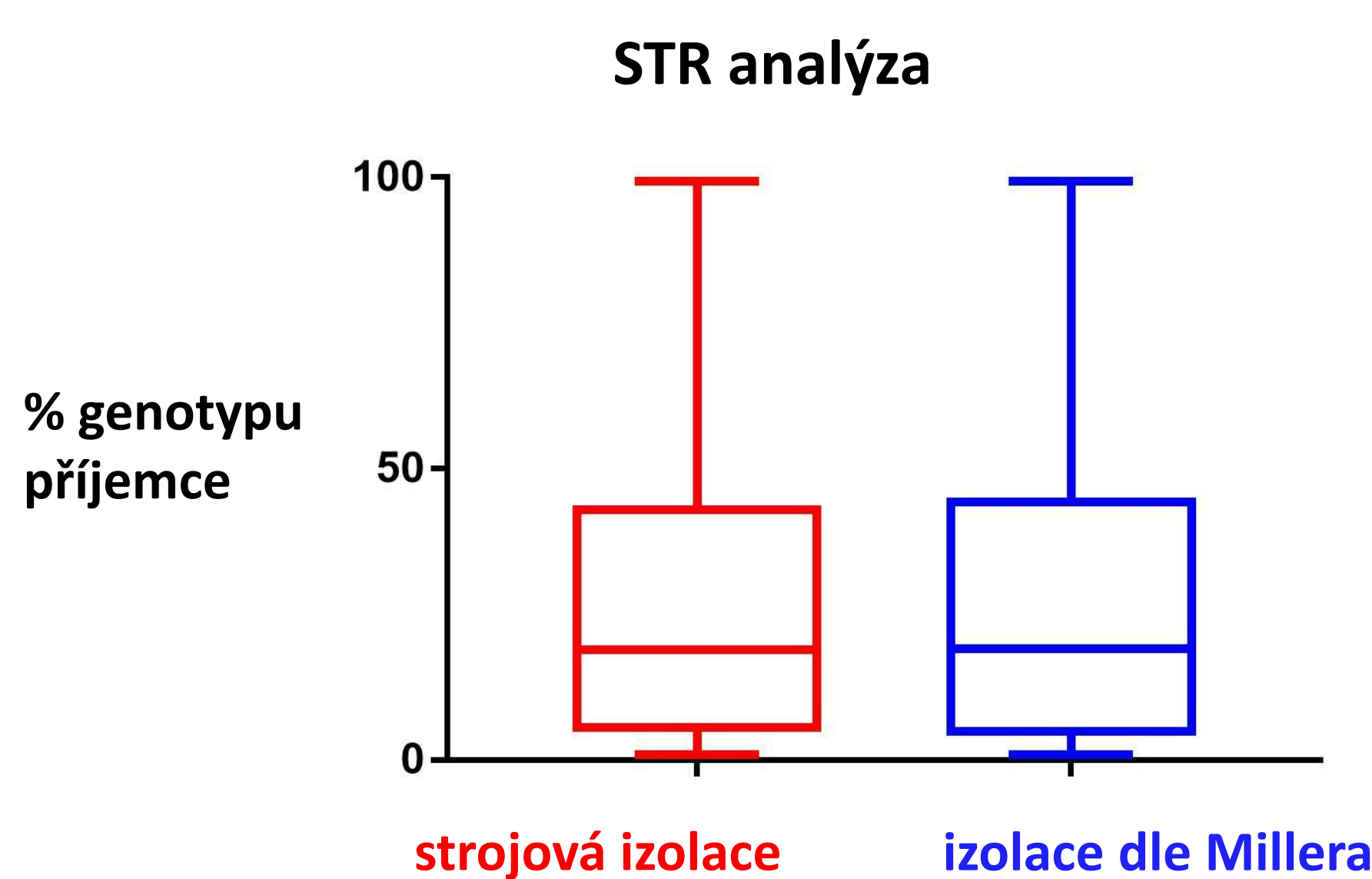
U výsledků kvantifikace robustnější metodou STR byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($p=0,9339$).

- nezáleží na zvolené metodě izolace DNA
- obě metody jsou vhodné k rutinnímu stanovení

qPCR

Při kvantifikaci citlivější metodou qPCR byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,0019$). Výsledná hodnota naměřeného chimerismu se lišila v závislosti na zvolené metodě izolace.

- mechanismus a možnosti izolační metody ovlivňují výslednou kvantifikaci



Závěr

Pro potransplantační monitorování buněčného chimerismu je zásadní sledovat trend míry chimerismu v čase. Narůstající hodnoty chimerismu by mohly naznačovat relaps

onemocnění. Pro zajištění relevantnosti a kontinuity výsledků je vhodné používat stejný způsob izolace, a to zejména při použití citlivé metody qPCR. Rutinně je tedy DNA na našem

pracovišti izolována metodou dle Millera, pouze při statimových vyšetřeních nebo u hypobuněčných vzorků je použita automatická izolace přístrojem.