

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В.

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ МЕТОДА INDEL ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», 610027, Киров, Россия

В ходе анализа данных литературы была сформирована панель олигонуклеотидов, включающая в себя праймеры и зонды к двадцати шести генетическим маркерам и к одному референсному гену. В результате оценки эффективности ПЦР в реальном времени на примере одного из маркеров (S01a) установлено оптимальное количество ДНК на реакцию (70 нг), обеспечивающее разрешающую способность методики не менее 0,1% с возможностью оценки линейного химеризма. Сформированная панель праймеров к генетическим полиморфизмам - InDel имеет высокую степень информативности для пар донор-реципиент Российской Федерации. За период с января 2018 по июнь 2019 года была проведена количественная оценка уровня линейного (CD3+, CD34+) и общего химеризма у 28 пациентов клиники института, получивших аллогенную трансплантацию ГСК. Результаты количественной оценки химеризма показаны на примере четырех пациентов.

Ключевые слова: мониторинг химеризма; ПЦР в реальном времени; генетические полиморфизмы InDel.

Для цитирования: Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В. Опыт внедрения метода InDel ПЦР в реальном времени для мониторинга количественного химеризма после аллогенной трансплантации костного мозга. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 762-768. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-762-768>

Cheranev V.V., Loginova M.A., Kutjavina S.S., Smirnova D.N., Zorina N.A., Minaeva N.V., Paramonov I.V.

EXPERIENCE INTRODUCTION OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHIMERISM AFTER ALLOGENIC STEM CELL TRANSPLANTATION BY REAL-TIME PCR WITH INDEL POLYMORPHISMS

FSBIS Kirov scientific-research institute of hematology and blood transfusion of FMBA of Russia, Kirov, 610027, Russian Federation

Using data obtained from domestic and foreign sources, we formed a set of primers and fluorogenic probes for analyzing twenty-six specific sequence polymorphisms and one reference gene. In the course of evaluating the effectiveness of real-time PCR, using the example of one of the markers (S01a), we obtained the optimal amount of DNA per reaction (70 ng), providing a resolution of at least 0.1% of the method with the ability to estimate linear chimerism. Formed panel of primers for genetic polymorphisms - InDel has a high degree of informational content for donor-recipient pairs of Russia. From January 2018 to June 2019, a quantitative assessment of the level of linear (CD3 +, CD34 +) and general chimerism was carried out for 28 patients of the clinic of the Institution. Finally, we analyzed patients who received allografts and present 4 different clinical situations that illustrate the informativity level of this method.

Key words: quantitative assessment of chimerism; real-time PCR; InDel polymorphisms.

For citation: Cheranev V.V., Loginova M.A., Kutjavina S.S., Smirnova D.N., Zorina N.A., Minaeva N.V., Paramonov I.V. Experience introduction of quantitative analysis of chimerism after allogenic stem cell transplantation by real-time PCR with InDel polymorphism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64(12): 762-768. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-762-768>

For correspondence: Loginova M.A., PhD, head of Research Laboratory of applied immunogenetics; e-mail: mlogin2010@gmail.com

Information about authors:

Cheranev V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5294-3033>
Loginova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7088-3986>
Kutjavina S.S., <http://orcid.org/0000-0002-2371-4044>
Smirnova D.N., <https://orcid.org/0000-0002-0090-1891>
Zorina N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1948-209X>
Minaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-8479-3217>
Paramonov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was supported by a grant «УМНИК» (contract №14113ГУ/2019).

Received 14.08.2019
Accepted 16.09.2019

Введение. Количественная оценка уровня химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является обязательным прогностическим инструментом, необходимым для оценки эффективности трансплантации, своевременной диагностики посттрансплантационных осложнений и коррекции терапии [1, 6, 9, 10]. В настоящее время для мониторинга химеризма применяют как гематологические (скрининг антигенов эритроцитов ABO, резус и др.), так и генетические подходы (RFLP, XY FISH, STR-ПЦР и VNTR-ПЦР с последующим электрофорезом, количественная ПЦР с праймерами к InDel и SNP маркерам). Указанные методы мониторинга химеризма характеризуются различной технической сложностью выполнения анализа, чувствительностью и воспроизводимостью [8].

Наибольшую распространенность в настоящее время получили мультиплексная ПЦР с праймерами к STR (Short Tandem Repeat) маркерам и количественная ПЦР с праймерами к InDel (Insertion/Deletion polymorphism) или SNP (Single Nucleotide Polymorphism) маркерам [2-7]. Первый метод востребован по причине наличия стандартизированной панели праймеров [7], относительно высокой чувствительности (до 1%), простоты и скорости исполнения, кроме этого, он не требует большого количества ДНК (примерно 10 нг на реакцию) [8, 10]. Второй метод характеризуется всеми преимуществами первого, но при этом имеет большую чувствительность (до 0,01%), что в сумме с детекцией химеризма в отдельных клеточных линиях позволяет более точно оценить течение посттрансплантационного периода [8, 10].

Метод определения биаллельного InDel полиморфизма основан на детекции локусов генома человека, которые имеют два взаимоисключающих аллеля. Один аллель несёт инсерцию (In) и содержит дополнительный фрагмент ДНК, встроенный в геном. Второй – имеет делецию (Del) и не содержит дополнительной последовательности. Длина дополнительного фрагмента, содержащегося в локусах, может варьировать от 1 до 10000 пар оснований [13], но в качестве мишени для проведения количественной ПЦР, как правило, используются микро InDel (от 1 до 50 пар оснований) [15]. Частота распределения и, как следствие, информативность InDel маркеров различна в каждой популяции [2, 5, 11, 12], при этом различия столь существенны, что на основе данных маркеров проводятся филогенетические исследования [14].

Широкое распространение в практике получила панель праймеров и зондов, разработанная в 2002 г. M. Alizadeh и соавт. [2], в дальнейшем она была дополнена M. Koldehoff и соавт. [3]. На данный момент во многих работах проведена оценка информативности, указанной выше InDel панели, для различных популяций [2, 5, 11, 12], однако для российской популяции данные до сих пор отсутствуют.

Цель исследования – апробировать и внедрить в клиническую практику методику мониторинга посттрансплантационного химеризма методом InDel ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. Биологический материал (периферическая кровь и костный мозг) для исследова-

ния был получен от 31 пары реципиент/донор клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. 28 пациентам была проведена аллогенная ТГСК (для трех пациентов она не состоялась по разным причинам).

Сортировку клеточных линий (CD34⁺; CD3⁺) проводили с использованием магнитных частиц, конъюгированных с антителами к соответствующим маркерам (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты ДНК для оценки уровня химеризма были получены методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAgen, Германия), концентрацию и показатель чистоты ДНК, которых оценивали на спектрофотометре (Infinite 200 PRO, TECAN).

Панель праймеров и зондов для проведения InDel ПЦР в реальном времени была сформирована на основании данных литературы [2-4]. Один праймер из пары был специфичен для аллеля, другой, как и зонд, отжигается на консервативном участке ДНК.

Классическую ПЦР для поиска информативных маркеров проводили в термоциклере Verity (Thermo Fisher Scientific, США), согласно температурному профилю программы амплификации (1 цикл – 5 мин при 95°C, 35 циклов – 15 с при 95°C, затем 45 с при 60°C). Каждая реакция содержала 1 мкл геномной ДНК, 5 мкл 2,5X-реакционной смеси (нуклеотиды, буфер, ROX, Mg²⁺, HS-полимераза), 300 нМ каждого праймера. Детекцию результатов осуществляли с использованием метода электрофореза в 2% агарозном геле.

При проведении количественной ПЦР в режиме реального времени в качестве флуоресцентной метки зонда использовали 5'-FAM, в качестве гасителя флуоресценции зонда – 3'-RTQ. Каждая реакция содержала 70 нг геномной ДНК, 10 мкл 2,5X-реакционной смеси (нуклеотиды, буфер, ROX, Mg²⁺, HS-полимераза), 300 нМ каждого праймера для амплификации и 200 нМ специфичного зонда. Амплификацию и детекцию сигнала проводили на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия), согласно температурному профилю: 1 цикл – 5 мин при 95°C, 40 циклов – 15 с при 95°C, затем 45 с при 60°C.

Эффективность ПЦР оценивали при помощи метода, описанного в работе M. Alizadeh и соавт. [2]. Для этого готовили 14 последовательных разведений (от 1:0 до 1:8000) ДНК пациента в ДНК донора, которые были использованы в качестве матрицы для 15 реакций (последняя выступала в качестве негативного контроля и содержала только ДНК донора). Для получения точного значения эффективности ПЦР по результатам реакции строилась прямая зависимости порогового цикла (C_t) от логарифма относительного количества ДНК пациента в реакции (рис. 1). Для подсчета эффективности использовали формулу:

$$E=10^{-1/s} - 1,$$

где s – коэффициент угла наклона прямой.

Наличие информативного маркера подтверждали проведением ПЦР в реальном времени: маркер считали информативным, если его C_t был в пределах от 21 до 25. В случаях, когда C_t маркера было равно или выше 32, сигнал считали неспецифическим. В дальнейшем проводили ПЦР в реальном времени и оценку C_t для ин-

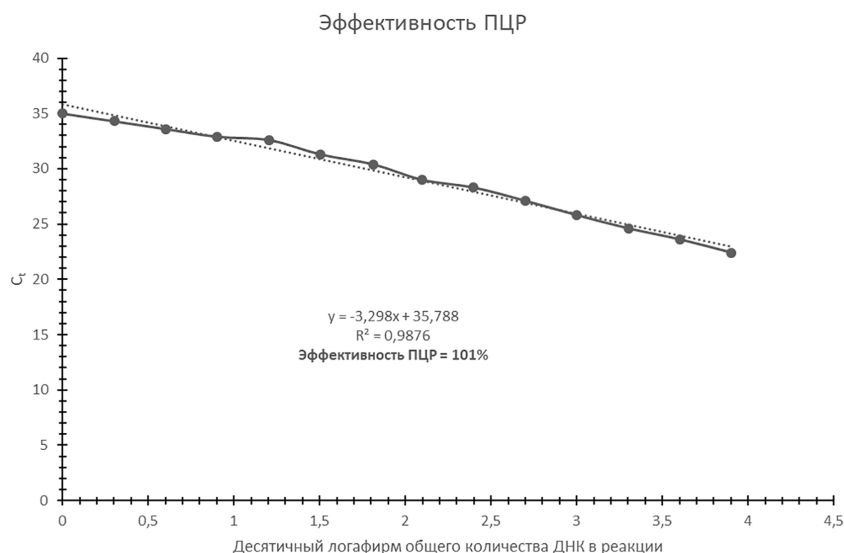


Рис. 1. Оценка эффективности ПЦР, проведенная для референсного гена GAPDH.

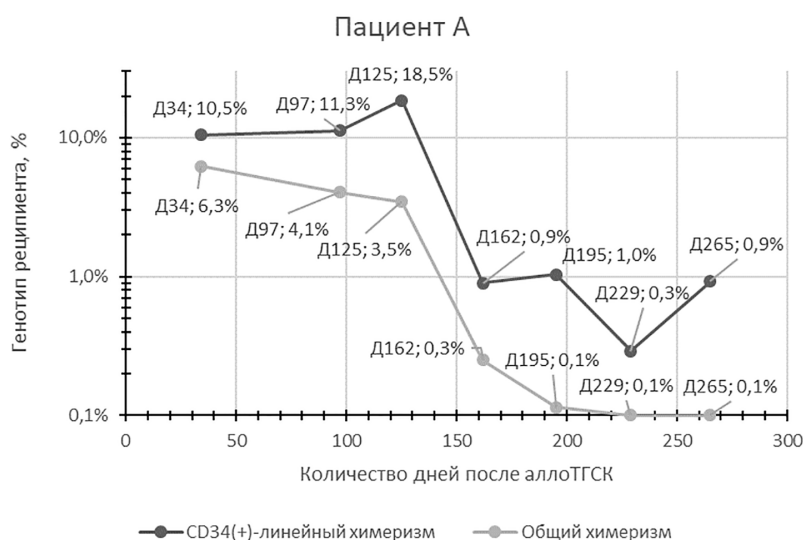


Рис. 2. Мониторинг уровня химеризма для пациента А. после алло ТГСК.

формативного маркера и референсного гена (GAPDH) в трех повторах до трансплантации и после. Данные по C_t до аллоТГСК выполняли функцию калибровочного образца при расчетах. Нормализованное значение порогового цикла рассчитывали, как $\Delta C_t = C_t$ (маркера) – C_t (референсного гена). Если исследуемый маркер проявлялся у пациента, и не проявлялся у донора, то такой маркер считали информативным для пациента и наоборот. При нахождении более чем 1 информативного маркера анализ проводился по всем найденным маркерам, но не более 3 маркеров для пары пациент/донор.

Анализ результатов проводили по формуле [2]:

$$QU/QC = 100 * (1+E)^{-(\Delta C_t U - \Delta C_t C)}$$

где QU – количество ДНК в образце после аллоТГСК; QC – количество ДНК в образце до аллоТГСК; $\Delta C_t U$ – нормализованное значение C_t в образце после аллоТГСК; $\Delta C_t C$ нормализованное значение

C_t для калибровочного образца; E – эффективность ПЦР информативного маркера.

Информативность каждого маркера рассчитывали, как отношение количества случаев, когда маркер был информативным, к общему количеству проанализированных пациентов и доноров.

Результаты. При проведении анализа литературных данных [2, 5, 11, 12] установлено, что для всех изученных популяций была показана низкая информативность маркера S05a. Для маркера ACE1428 - высокий уровень неспецифической амплификации [5]. По этим причинам от данных маркеров отказались на этапе формирования панели реагентов. Оценка работоспособности праймеров и ПЦР-микса была проведена при помощи рутинной ПЦР, оценка работоспособности зондов – при помощи ПЦР в реальном времени. В результате оценки работоспособности

зондов, праймеров и ПЦР-микса из финальной панели реактивов исключили маркер S06 из-за низкого уровня сигнала, который не позволял провести количественную оценку.

Все пары реципиент/донор были исследованы по 25 потенциально информативным локусам. Количество найденных информативных маркеров в неродственных парах реципиент/донор составляло от 4 до 13 (медиана – 8,5), в родственных – от 2 до 10 (медиана 5). Следует отметить, что информативных маркеров не было найдено лишь для одного донора.

Теоретически достижимая чувствительность данной методики составляет 0,01% выявляемых клеток [2,5]. Она напрямую зависит от количества ДНК, вносимой в реакцию. Как было ранее показано, максимальная чувствительность достигается при внесении в реакцию 250 нг [2] и 120 нг [5]. Следует отметить, что при внесении в реакцию 15 нг ДНК мониторинг химеризма также возможен, но чувствительность метода снижается до значения около 1% (в зависимости от информативного маркера) [11]. Эта проблема становится особенно актуальной при решении задач мониторинга химеризма в отдельных клеточных линиях, когда невозможно получить исследуемую пробу с высокой концентрацией ДНК (нг) [11]. При проведении оценки эффективности ПЦР при количестве исследуемой ДНК пациента 0,03 нг и ниже (0,042% от 70 нг собственной ДНК) пороговый цикл (C) варьирует между дублями сильнее допустимого значения (0,5 цикла) [5]. Таким образом, если у пациента уровень собственных клеток опускается ниже 0,1%, то данная методика не позволяет провести количественную оценку уровня химеризма с достаточной точностью. На основании этого был сделан вывод, что чувствительность методики составляет не менее 0,1%.

Адаптированная нами методика определения количественного химеризма с использованием InDel ПЦР была внедрена в практику ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. За период с января 2018 по июнь 2019 г. проведена количественная оценка уровня линейного (CD3+, CD34+) и общего химеризма для 28 пациентов клиники Учреждения, получивших аллогенную трансплантацию ГСК. Ниже представлены примеры использования метода в различных клинических ситуациях.

Случай 1. Пациент А., мужчина (41 год). Диагноз: опухоль из бластоидных плазматоидных дендритных клеток. Проведена аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. Мониторинг химеризма проводился на протяжении 265 дней. На рис. 2 изображены данные, полученные при мониторинге химеризма. На +34 сут после трансплантации выявлен высокий уровень собственных клеток как при оценке общего, так и линейного химеризма. На +125 сут наблюдалось дальнейшее повышение содержания собственных клеток в CD34+ - линии до 18,5%. После корректировки терапии на +229 сут уровень общего химеризма достиг предела чувствительности метода (менее 0,1%). Линейный химеризм (CD34+) после снижения на +265 сут установился на уровне 162 и 195 дней.

Случай 2. Пациент В., мужчина (21 год). Диагноз: острый миелоидный лейкоз M₁-вариант. Проведена

Информативность InDel маркеров для различных популяций

Маркер	Информативность маркера в популяции, %				
	Ренн, Франция	Эрланген, Германия	Тайпей, Тайвань	Минск, Беларусь	Киров, Россия
S 01a	23,6	22,6	33,0	47,2	9,7
S 01b	н/д	14,2	13,0	н/д	14,5
S 02	36,4	24,9	5,0	47,2	17,7
S 03	16,4	19,4	27,0	35,1	22,6
S 04a	23,6	20,0	28,0	51,4	12,9
S 04b	12,7	20,0	18,0	11,1	14,5
S 05a	1,8	0,0	0,0	н/д	н/д
S 05b	27,3	24,4	44,0	35,0	16,1
S 06	31,0	25,0	44,0	27,0	н/д
S 07a	31,0	21,1	21,0	47,0	22,6
S 07b	21,8	24,8	36,0	40,5	14,5
S 08a	16,4	18,1	9,0	38,9	12,9
S 08b	20,2	18,4	45,0	32,4	12,9
S 09a	7,3	5,0	2,0	н/д	6,5
S 09b	14,5	23,7	34,0	30,6	21,0
S 10a	25,5	21,6	7,0	н/д	16,1
S 10b	20,2	21,1	29,0	25,0	9,7
S 11a	25,5	24,9	36,0	47,2	12,9
S 11b	7,3	15,0	9,0	25,0	6,5
ACE 1721	н/д	н/д	н/д	30,6	8,1
GST 194	н/д	н/д	н/д	22,2	14,5
MID402	н/д	н/д	н/д	н/д	9,7
MID668a	н/д	н/д	н/д	н/д	19,4
MID668b	н/д	н/д	н/д	н/д	8,1
MID836a	н/д	н/д	н/д	н/д	19,4
MID836b	н/д	н/д	н/д	н/д	11,3
MID847	н/д	н/д	н/д	н/д	11,3
Медиана	21,0	21,1	27,5	35,0	12,9

первая аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. При анализе химеризма на +27 сут выявили более 80% собственных клеток и крайне низкую концентрацию ДНК (C=3 нг/мкл), выделенную из общей популяции клеток костного мозга, что было обусловлено первичным неприживлением трансплантата. Далее была проведена вторая аллогенная ТГСК от гаплоидентичного (5/10) родственного донора. На +32 сут после аллоТГСК наблюдаемый уровень собственных клеток составлял менее 0,8% в общей популяции и 3,2% в CD34+-линии. Далее наблюдалось медленное снижение уровня содержания собственных клеток при мониторинге линейного и общего химеризма (рис. 3). На +159 день мониторинга содержание собственных клеток достигло отметки ниже чувствительности метода (менее 0,1%) при оценке общего и 0,175% при оценке линейного (CD34+) химеризма. На +187 день наблюдалось нарастание уровня собственных клеток в общей популяции и CD34+ - линии. Корректировка терапии способствовала восстановлению донорского химеризма на +209 сут.

Случай 3. Пациент С., мужчина (27 лет). Диагноз: острый лимфобластный лейкоз про-Т-вариант. Про-

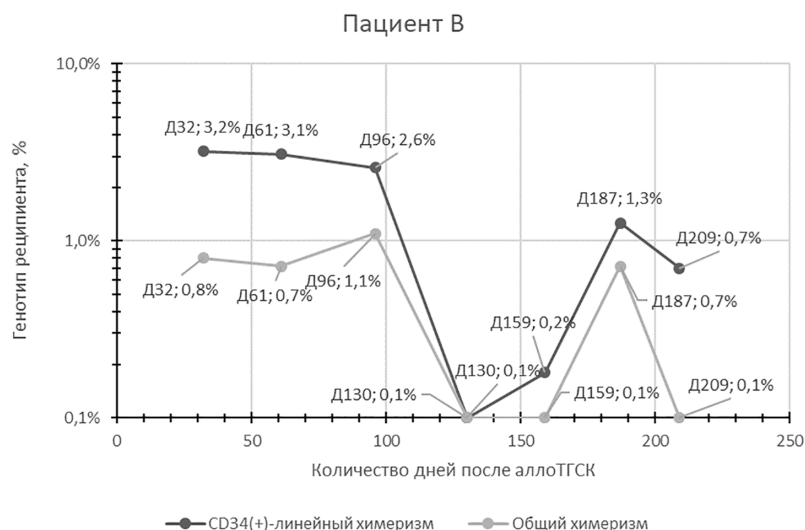


Рис. 3. Мониторинг уровня химеризма для пациента В. после аллотГСК.

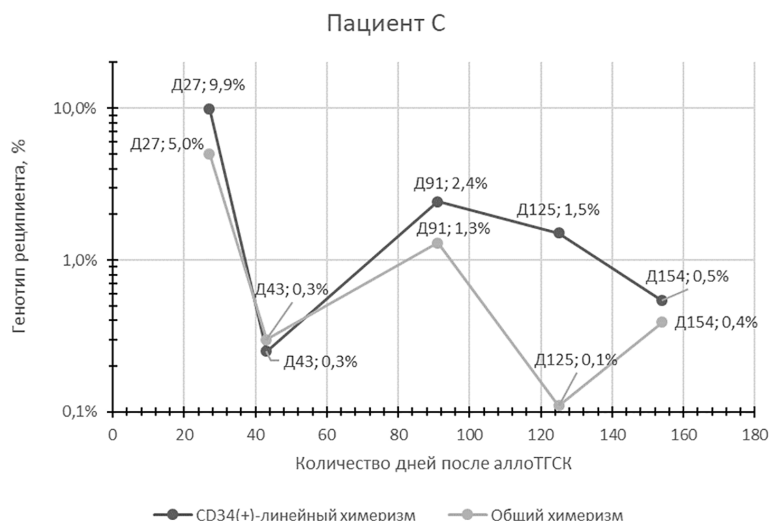


Рис. 4. Мониторинг уровня химеризма для пациента С. после аллотГСК.

ведена аллогенная ТГСК от гаплоидентичного (5/10) родственного донора. На +24 сут наблюдаемый уровень собственных клеток составлял 5% в общей популяции и 9,9% в CD34+-линии. Затем на +41 сут наблюдалось быстрое снижение уровня собственных клеток (рис. 4). На 43 день мониторинга значение собственных клеток достигло отметки 0,31% при оценке общего и 0,25% при оценке линейного (CD34+) химеризма. В дальнейшем процент собственных клеток не превышал 3% как в общей популяции клеток костного мозга, так и в CD34+-линии.

Случай 4. Пациент D., мужчина (38 лет). Диагноз: хронический лимфолейкоз. Проведена аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. На +21 сут наблюдаемый уровень собственных клеток составлял около 40% в общей популяции, CD34+-линии и CD3+-линии. На +70 день мониторинга содержание собственных клеток в костном мозге снизилось до 27% при оценке общего

и 33% при оценке линейного (CD34+) химеризма. Далее на +76 день после аллогенной ТГСК был выполнен повторный анализ химеризма с использованием в качестве исследуемого материала периферической крови. Уровень собственных клеток общей популяции составил 33%, в свою очередь уровень в CD3+-линии составил 9,1% (рис. 5). Указанная картина характерна для острой реакции трансплантат против хозяина [16,17], что подтверждалось клиническими проявлениями. На +128 день после трансплантации уровень собственных клеток пациента в периферической крови составил около 34% в общей популяции и 30% в CD3+-линии.

Обсуждение. Результаты сравнения значений информативности InDel маркеров, полученных для пар реципиент/донор клиники учреждения, с данными других исследований [2, 5, 11, 12] представлены в таблице.

Из данных, представленных в таблице видно, что пары маркеров S09a и S09b, S11a и S11b показа-

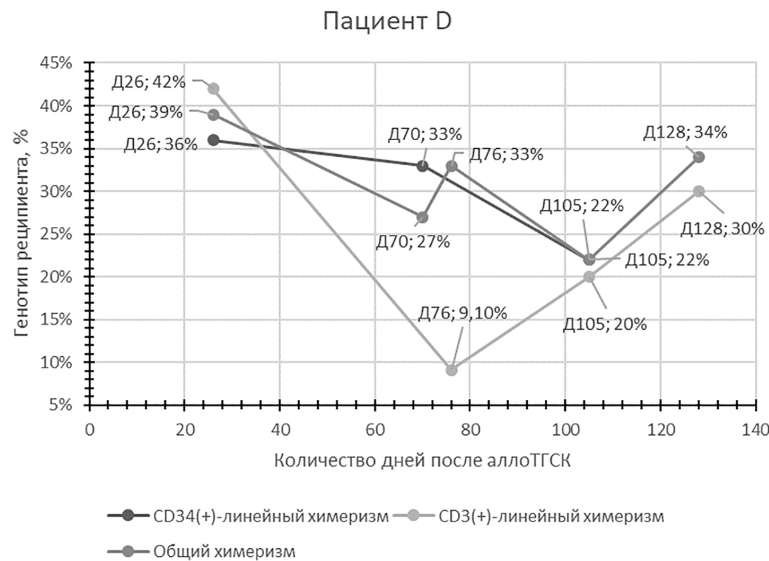


Рис. 5. Мониторинг уровня химеризма для пациента D. после аллотГСК.

ли идентичное соотношение информативности внутри локуса для всех популяций; информативность пар маркеров S01a и S01b, S04a и S04b, S07a и S07b изучаемой популяции оказалась противоположна результатам, полученным ранее для других популяций. Данные по группе парных маркеров S08a и S08b, S10a и S10b имели значительное отличие только по сравнению с данными для тайваньской популяции.

Для оценки соотношения информативности маркеров, при исследовании которых не детектировался второй аллель, проводили сравнение с медианой информативности всех маркеров. В результате было установлено, что маркеры S02 (за исключением тайваньской популяции), S05b, GST194 и ACE1721 обладают схожей информативностью относительно медианы во всех популяциях. Для маркера S03 было установлено значение сильно выше медианного, по сравнению с данными предыдущих исследований, что свидетельствует о высокой информативности маркера для изучаемой выборки.

Часть маркеров (S01a, S09a, S10b, S11b, ACE1721, MID402, MID 668b, MID836b, MID847) обладает невысокой информативностью, по отношению к медиане. В связи с этим было решено выделить эти маркеры в подгруппу низкоинформативных, остальные – в подгруппу высокоинформативных. Использование на первом этапе высокоинформативной подгруппы позволит сократить временные и материальные затраты на этапе поиска маркеров, приемлемых для конкретной пары реципиент/донор. Если этих маркеров будет недостаточно (менее 3 информативных для пациента), то необходимо будет провести поиск по низкоинформативной подгруппе.

Выводы.

Сформированная панель InDel маркеров для мониторинга количественного химеризма успешно апробирована и внедрена в клиническую практику в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Все маркеры по информативности были разделены на высокоинформативные (информативность не менее 12,9%) – 16 маркеров, низкоинформативные (информативность менее 12,9%) – 9. Учёт информативности потенциальных маркеров позволяет сократить материальные и временные затраты на этап поиска информативных маркеров.

Снижение чувствительности метода до 0,1% не сказалось на прогностической способности метода. При необходимости чувствительность может быть повышена за счет увеличения количества ДНК, используемого в исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта «УМНИК» (Договор №14113ГУ/2019 (код 0047159)).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-9, 11-17 см. REFERENCES)

- Лавриненко В.А., Савицкая Т.В., Волочник Е.В., Марейко Ю.Е., Алейникова О.В. Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами. *Онкогематология*. 2014; 9 (2): 29-36.
- Блау О.В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология*. 2013; 6(1): 34-9.

REFERENCES

- Lukanov T., Ivanova-Shivarova M., Naumova E. Chapter 4. Monitoring of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering*. Rijeka: IntechOpen; 2018: 77-93.
- Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C. et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002; 99(12): 4618-25.
- Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M., Beelen D.W., Elmaagacli

- А.Н. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am. J. Hematol.* 2006; 81(10): 735–46.
4. Scheffer P.G., van der Schoot C.E., Page-Christiaens G.C., Bossers B., van Erp F., de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2010; 115(1): 117–26.
 5. Lavrinenko V.A., Savitskaya T.V., Volochnik E.V., Mareyko Yu.E., Aleynikova O.V. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods. *Onkogematologiya.* 2014; 9 (2): 29–36. (in Russian)
 6. Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35(2): 107–19.
 7. Lion T., Watzinger F., Preuner S., Kreyenberg H., Tilanus M., de Weger . et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2012; 26: 1821–8.
 8. Gineikiene E., Stoskus M., Griskevicius L. Recent advances in quantitative chimerism analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009; 9(8): 817–32.
 9. Jacque N., Nguyen S., Golmard J.L., Uzunov M., Garnier A., Leblond V. et al. Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(2): 259–65.
 10. Blau O.V. Chimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2013; 6(1): 34–9. (in Russian)
 11. Bach C., Tomova E., Goldmann K., Weisbach V, Roesler W., Mackensen A., et al. Monitoring of Hematopoietic Chimerism by Real-Time Quantitative PCR of Micro Insertions/Deletions in Samples with Low DNA Quantities. *Transfus. Med. Hemother.* 2015; 42(1): 38–45.
 12. Chen D.P., Tseng C.P., Wang W.T., Wang M.C., Tsai S.H., Sun C.F.. Real-time biallelic polymorphism–polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412 (7–8): 625–30.
 13. Mullaney J. M., Mills R. E., Pittard, W. S. Devine S. E. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human Molecular Genetics.* 2010; 19 (2): 131–6.
 14. Vali U., Brandstrom M., Johansson M., Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics.* 2008; 9(1): 8.
 15. Gonzalez K.D., Hill K.A., Li W., Scaringe W.A., Wang J.C., Gu D. et al. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline. *Hum. Mutat.* 2007; 28 (1): 69–80.
 16. Breuer S., Preuner S., Fritsch G, Daxberger H., Koenig M., Poetschger U. et al. Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2012; 26(3): 509–19.
 17. Martinez-Laperche C., Noriega V., Kwon M., Balsalobre P., Gonzalez-Rivera M., Serrano D. et al. Achievement of early complete donor chimerism in CD25-activated leukocytes is a strong predictor of the development of graft-versus-host-disease after stem cell transplantation. *Experimental Hematology.* 2015; 43(1): 4–13.

Поступила 14.08.19

Принята к печати 16.09.19