

© Коллектив авторов, 2016 г.
УДК [616.41-089.843-06]: 61.001.57

**И. С. Моисеев, Е. А. Бурмина,
А. В. Ботина, М. О. Попова,
А. Р. Муслимов, О. Г. Смыкова,
К. В. Лепик, К. В. Мельситова,
А. И. Шакирова, И. М. Бархатов,
В. В. Байков, О. В. Галибин**

ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА И РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация костного мозга (аллоТКМ) — радикальный метод лечения широкого спектра гемобластозов высокого риска и наследственных заболеваний [1]. Однако это одна из самых консервативных областей медицины. Во многих центрах России и Европы до сих пор используются протоколы трансплантации и профилактики осложнений, разработанные в 1970-х гг. [12]. Это связано с тем, что одно из наиболее грозных осложнений, реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), может приводить к летальному исходу даже при адекватной профилактике у 10–20 % пациентов [10]. Использование же непроверенных протоколов профилактики РТПХ может значительно повышать летальность. Поэтому ведущую роль в совершенствовании технологии аллоТКМ играет моделирование РТПХ на лабораторных животных. Кроме того, эти же модели широко используются для оценки эффективности новых иммуносупрессивных препаратов [14].

Наиболее распространено моделирование аллоТКМ и РТПХ на мышах, что связано с доступностью линейных, т. е. генетически идентичных, животных, определяющих возможность получения воспроизводимых результатов. К основным линиям мышей, которые используются при моделировании аллоТКМ, относятся Balb/c, C57Bl/6, C3H и CAF1 [14].

В качестве кондиционирования, которое обеспечивает приживание донорского костного мозга, используются как специальные системы для тотального гамма-облучения животных, так и различные химиопрепараты, включая бусульфан, мелфалан,

циклофосфан, флударабин и треосульфат [11]. В настоящем исследовании протестирована применимость реципрокных вариантов линейной аллоТКМ с использованием мышей линий Balb/c и C57Bl/6. Химиотерапевтическая подготовка выполнялась с помощью бусульфана и циклофосфана, которые широко используются и не требуют условий специализированной радиологической лаборатории.

Кроме того, в данном исследовании мы попытались приблизить результаты модели к ситуации аллоТКМ с высоким риском РТПХ у человека. Во-первых, была использована профилактика РТПХ посттрансплантационным циклофосфаном, который увеличивает вероятность приживания трансплантата [8], и обеспечивает выживаемость мышей в диапазоне 50–70 % [15]. Во-вторых, учитывая, что в патогенез РТПХ у человека значимый вклад вносят сапрофитные бактерии, грибы и простейшие, присутствующие в организме на фоне противомикробной профилактики [7, 16], в настоящем эксперименте была проверена возможность моделирования аллоТКМ с использованием животных, не имеющих SPF-статуса (свободных от патогенной флоры), содержащихся в условиях конвенционального вивария (без HEPA-фильтрации воздуха).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты выполнены на самцах и самках мышей Balb/c и C57Bl/6 (ФГУП «Питомник лабораторных животных РАППОЛОВО», Ленинградская обл.) в возрасте 12–14 недель, которых содержали группами в клетках стандарта ТПН (*Tecniplast*, Италия) в виварии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Перед началом эксперимента проводилась карантинизация не менее 2 недель. Животные имели неограниченный доступ к комбинированному корму «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Московская обл., Пущино) и кипяченой водопроводной воде с добавлением противомикробных препаратов и подкислением по следующей схеме: бисептол (1 мг/мл) — за 14 дней до трансплантации, флуконазол (100 мкг/мл) — с момента трансплантации, левофлоксацин (20 мкг/мл) — с 7-го дня после трансплантации. Для подкисления питьевой воды использовали лимонную кислоту, создавая 3%-ю концентрацию раствора с рН = 2,5–3. Подкисление питьевой воды завершалось на 5-й день после трансплантации для аллоТКМ и в день трансплантации для сингенных ТКМ.

Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями «Руководства по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» [2]. Эвтаназию мышей проводили методом цервикальной дислокации.

Дизайн эксперимента (экспериментальные группы). В экспериментах использовали следующие

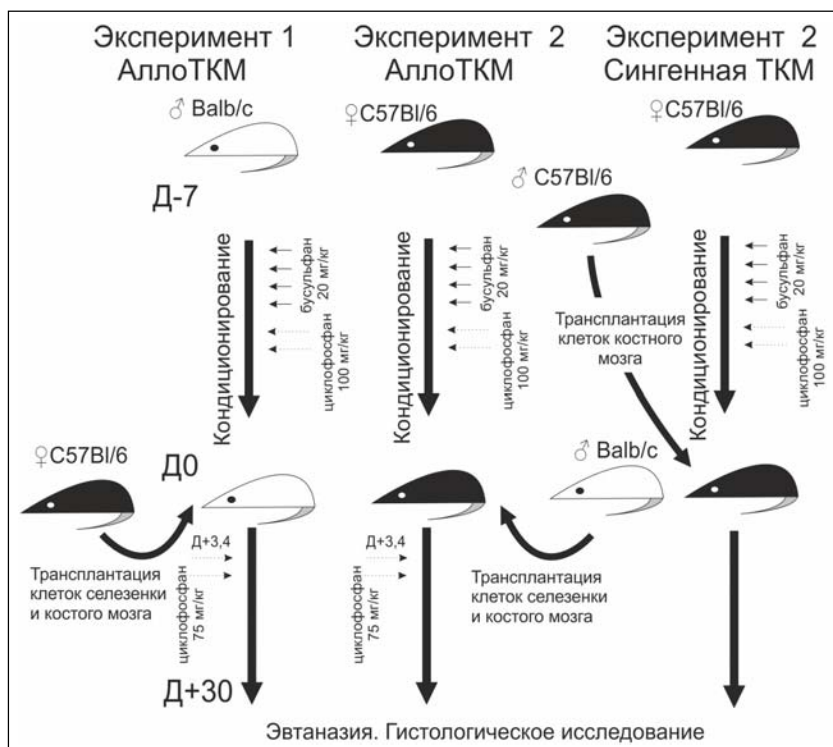


Рис. 1. Схема экспериментов

комбинации доноров и реципиентов: аллогенная трансплантация + C57Bl/6 -> > Balb/c > Balb/c -> + C57Bl/6, сингенная трансплантация (контроль) > C57Bl/6-> + C57Bl/6. Схема экспериментов представлена на рис. 1.

Кондиционирование. Для кондиционирования использовали бусульфан (*Sigma Aldrich*, Швеция), который вводили (*ip*) в дозе 20 мг/кг ежедневно в течение 4 дней (день -7 и день -4) и циклофосфамид (*Endoxan, Baxter*, США) - 100 мг/кг (*ip*) в течение 2 дней (день -3 и день -2). Бусульфан разводили в 20 % DMSO, 80 %-пропиленгликоле, далее полученный раствор разводили водой для инъекций в соотношении 1:1. Конечный объем раствора бусульфана составлял 50 мкл. Циклофосфамид разводили в 0,9 %-м изотоническом растворе NaCl и вводили *ip* в объеме 50 мкл/животное.

Подготовка и введение трансплантата. Трансплантат заготавливали из бедренных, большеберцовых, плечевых костей и селезенки, которые транспортировали в лабораторию в транспортной среде (1x PBS, 2 % FBS, 2 мМ EDTA, 50 Е/мл стрептомицина). Получение костного мозга осуществляли в ламинарном боксе в стерильной чашке Петри методом промывания костей одного животного в 5 мл буфера (1x PBS, 2 мМ EDTA). Процессинг селезенки выполняли методом раздавливания между двумя стерильными предметными стеклами в стерильной чашке Петри с буфером (1x PBS, 2 мМ EDTA). Полученные трансплантаты костного мозга и се-

лезенки фильтровали через инфузионный фильтр с порами 200 мкм, центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, удаляли супернатант и проводили ресуспензирование в буфере. Целевым значением клеточности для костного мозга было 2×10^7 ядродержащих клеток/животное, для клеток селезенки - 3×10^7 ядродержащих клеток/животное. Трансплантат для сингенных трансплантаций состоял только из клеток костного мозга, для аллогенных - из клеток костного мозга и селезенки. Введение трансплантата осуществлялось в день 0, в хвостовую вену. При невозможности катетеризации трансплантат вводился интраперитонеально.

Профилактику РТПХ при аллогенных трансплантациях проводили, используя циклофосфамид (*Endoxan, Baxter*, США) в дозе 75 мг/кг в течение 2 дней (день +3 и день +4).

Гистологическое исследование.

Через 30 дней после трансплантации проводили эвтаназию животных и забирали для гистологического исследования следующие органы: кожу, желудочно-кишечный тракт (желудок, тонкая кишка, толстая кишка), печень, легкие, селезенка и костный мозг. Полученный материал фиксировали в растворе 10 %-го нейтрального забуференного формалина, осуществляя процедуру проводки в автоматическом режиме на *Microm STP 120 (Thermo Fisher Scientific/Shandon*, США). Окраска гистологических препаратов осуществлялась гематоксилин-эозином. Наличие и степень тяжести гистологических проявлений РТПХ оценивали в соответствии с международными патологоанатомическими критериями [13].

Статистический анализ. Для сравнения веса животных в группах аллоТКМ и сингенной ТКМ использовался критерий Манна - Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Реципиенты Balb/c. В качестве доноров (соотношение 1:1) использовали 15 самок C57Bl/6, реципиенты группы аллоТКМ - самцы Balb/c (N = 10), группы сингенной ТКМ (контроль) - самцы C57Bl/6 (N = 5). Целевые значения клеточности трансплантата костного мозга при использованном соотношении доноры/реципиенты (1:1) достигнуты не были - средняя клеточность трансплантата составляла $1,2 \times 10^7$ ядродержащих клеток/животное. Клеточность трансплантата клеток селезенки была целевой.

Как в группе аллоТКМ, так и в группе сингенной ТКМ отмечалась выраженная токсичность режима кондиционирования и посттрансплантационного циклофосфана. Через 10 дней после трансплантации летальность достигала 80 % в обеих группах (рис. 2, а), и только 3 животных дожили до 30-го дня после трансплантации. Гистологическое исследование выявило оРТПХ кишечника 1-й степени у одного (из 2-х) животных из группы аллоТКМ.

Реципиенты C57Bl/6. В качестве доноров (соотношение 1,5:1) использовали 22 самца Balb/c для аллоТКМ и 8 самцов C57Bl/6 для сингенной ТКМ, реципиенты группы аллоТКМ – самки C57Bl/6 (N = 15), группы сингенной ТКМ (контроль) – самки C57Bl/6 (N = 6).

При использованном соотношении «донор/реципиент» (1,5:1) была достигнута целевая клеточность трансплантата как по костному мозгу ($2,3 \times 10^7$ ядродержащих клеток/животное), так и по селезенке ($3,1 \times 10^7$ ядродержащих клеток/животное). У 29 % животных удалось осуществить внутривенное введение трансплантата, у 71 % – интраперитонеальное.

В каждой группе было отмечено по одной токсической смерти на режиме кондиционирования. Остальные животные дожили до плановой эвтаназии на 30-й день после трансплантации (рис. 2, б). Динамика массы тела животных была сопоставима в группах контроля и аллоТКМ, хотя исходный вес мышей из группы сингенной ТКМ был значительно меньше ($15,5 \pm 1,6$ г против $16,9 \pm 2,7$ г, $p = 0,05$).

Вес животных в группах сингенной и аллоТКМ перед эвтаназией достоверно не различался ($15,7 \pm 2,2$ против $16,9 \pm 2,2$, $p = 0,25$). Таким образом, не отмечено снижения веса в группе аллоТКМ после приживления. Приживление и удовлетворительное функционирование трансплантата зафиксировано у всех выживших животных на основании гистологического исследования костного мозга.

При гистологическом исследовании признаки острой РТПХ были выявлены у 13 из 14 (93 %) реципиентов аллоТКМ. Были выявлены гистологические проявления РТПХ в коже (рис. 3, б), желудке и кишечнике (рис. 3, в), печени (рис. 3, г). Гистологическая тяжесть РТПХ ни у одного из животных не превышала 2-ю степень. Распределение по степеням тяжести показано на рис. 3, а. В группе сингенных трансплантаций гистологические признаки РТПХ выявлены не были.

Также у 6 животных выявлен локальный флебит печеночных синусоид, который может быть свидетельством вено-окклюзионной болезни печени легкой степени. В коже и желудочно-кишечном тракте у большинства животных были выявлены признаки бактериальной инфекции (колит, энтерит, гастрит, дерматит) различной степени выраженности, от минимальных до умеренных.

В ходе экспериментов было показано, что модель с химиотерапевтическим кондиционированием и комбинацией донора/реципиента C57Bl/6/ Balb/c не является приемлемой. Это связано с повышенной чувствительностью мышей линии Balb/c как

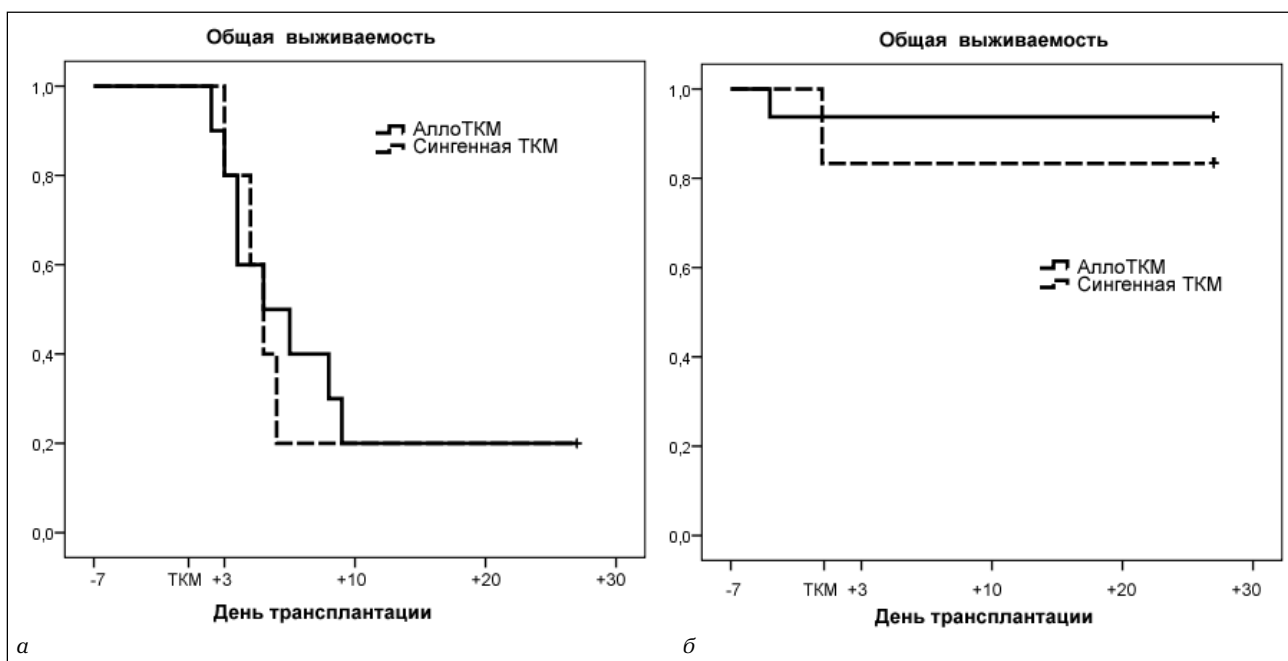


Рис. 2. Выживаемость животных после трансплантации костного мозга: а – доноры – +C57Bl/6 (N = 15); реципиенты: >Balb/c (N = 10) – при аллоТКМ, >C57Bl/6 (N = 6) – при сингенной ТКМ; б – реципиенты – +C57Bl/6 (N = 20); доноры: >Balb/c (N = 22) – при аллоТКМ, >C57Bl/6 (N = 8) – при сингенной ТКМ

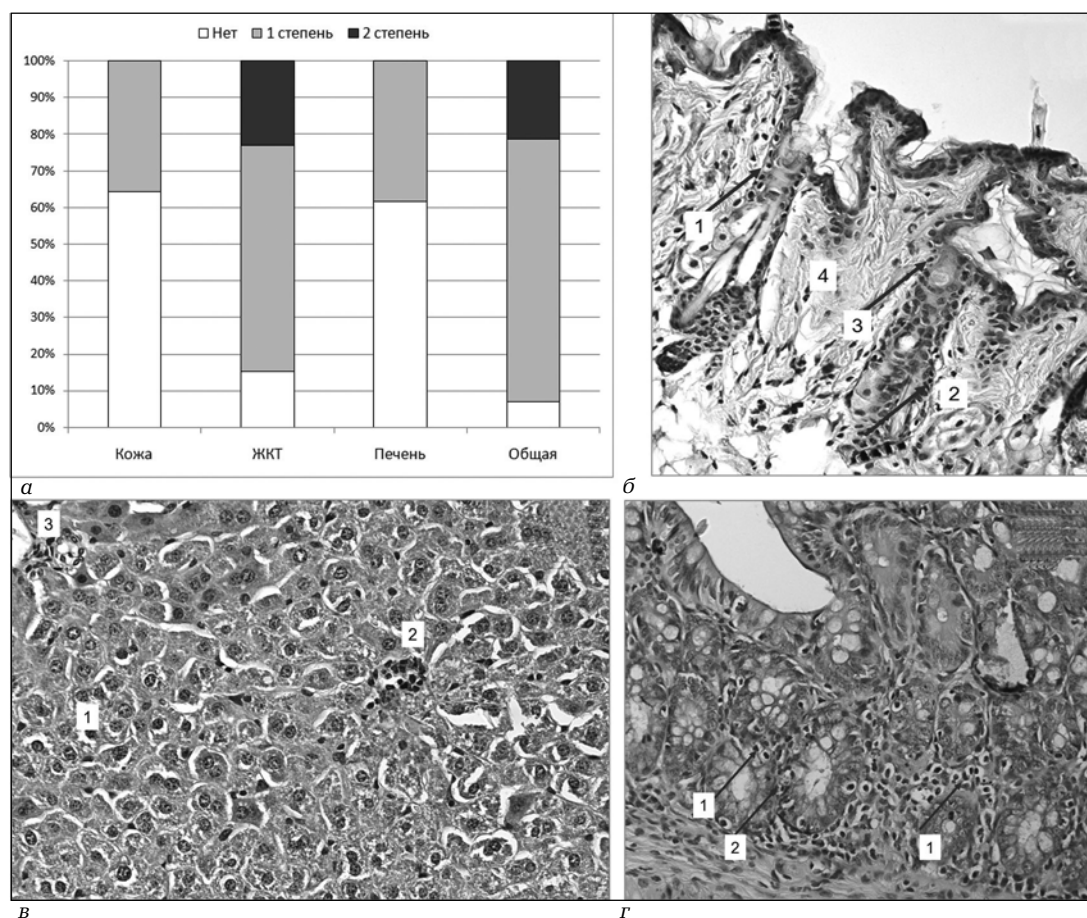


Рис. 3. Проявления острой реакции «трансплантат против хозяина» у C57Bl/6-реципиентов при аллоТКМ: а – частота РТПХ по органам и степени тяжести; б – РТПХ кожи: 1 – очаговая вакуолизация клеток базального слоя эпидермиса и придатков кожи; 2 – немногочисленные интраэпителиальные лимфоциты; 3 – единичные апоптозные тела; 4 – отек дермы; в – РТПХ печени: 1 – вакуольная дистрофия гепатоцитов; 2 – скопление лимфоцитов в стенке вены; 3 – единичные лимфоциты в эпителии желчных ходов; г – РТПХ кишечника: 1 – повышение количества интраэпителиальных лимфоцитов; 2 – клетки крипты в состоянии апоптоза

к химиотерапии, так и к облучению, по сравнению с мышами линии C57Bl/6 [4]. Это объясняет крайне высокий процент острой летальности, наблюдавшийся у реципиентов Valb/c как после сингенной, так и после аллоТКМ. Комбинация «донор/реципиент» Valb/c /C57Bl/6, в свою очередь, показала крайне низкую токсическую летальность, не превышающую 5–10 %, и может, таким образом, быть использована для моделирования аллоТКМ и РТПХ.

Первый эксперимент выявил также необходимость использования соотношения доноров/реципиентов 1,5:1, а не 1:1 из-за недостаточной клеточности трансплантата.

Кроме этого, было показано, что противомикробная профилактика с использованием комбинации сульфаметоксазола/триметоприма, левофлоксацина и флуконазола предотвращает летальность животных в агранулоцитозе. Тем не менее выявленные гистологически бактериальные инфекции у реципиентов, в первую очередь с вовлечением желудочно-

кишечного тракта, свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования режимов антибактериальной профилактики. В качестве перспективных препаратов можно рассматривать тетрациклин [3] и рифаксимин [17].

На модели аллоТКМ Valb/c / C57Bl/6 с профилактикой РТПХ циклофосфаном 75 мг/кг на 3-й и 4-й день после трансплантации не наблюдали летальности от РТПХ; более того, отмечали проявления только легкой и умеренной РТПХ по данным гистологического исследования. Между тем ранее сообщалось, что использование такой профилактики после тотального облучения при аллоТКМ C57Bl/6 /CAF1/J приводит к 30–50 %-й летальности от РТПХ [15]. Косвенным свидетельством отсутствия выраженной РТПХ является и отсутствие снижения веса реципиентов после приживления, что является отличительной чертой моделей РТПХ [11]. Различия в полученных нами и ранее описанных результатах могут быть связаны как с использован-

ными линиями животных, так и с тем фактом, что тотальное облучение вызывает более выраженное повреждение тканей и ассоциировано с повышенной частотой РТПХ [5]. Безусловно, модель без летальности от РТПХ и снижения веса требует дальнейшего совершенствования, так как не позволяет оценивать эффективность новых подходов в профилактике. Один из методов, который позволит в будущем увеличить тяжесть проявлений РТПХ, — это сокращение кратности введения циклофосфана с двух до одного на 3-й день после трансплантации. Ранее было показано, что уменьшение количества введений увеличивает частоту тяжелой РТПХ на 15–20% [9]. Второй из возможных подходов — увеличение количества трансплантируемых спленоцитов [6]. Вероятнее всего, дальнейшее совершенствование модели потребует использования обоих подходов.

В заключение можно сказать, что модель алло-ТКМ и РТПХ на основе линий мышей Balb/c/C57Bl/6 с кондиционированием комбинацией бусульфана и циклофосфана и профилактикой РТПХ циклофосфаном после трансплантации является перспективной для исследования новых иммуносупрессивных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-34-60142 мол_a_гк.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев Б. В., Зубаровская А. С., Моисеев И. С. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы // Росс. журн. дет. гематол. и онкол. — 2015. — № 2. — С. 28–42.
2. Белозерцева И. В., Драволлина О. А., Тур М. В. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. И. П. Павлова / под ред. Э. Э. Звартау. — СПб.: СПбГМУ, 2014. — 79 с.
3. Burgmann P. P. D. Antimicrobial drug use in rabbits and rodents. — 2nd ed. — Ames (IA): Iowa State University Press, 1993. — P. 524–541.
4. Duran-Struock I R., Dysko R. C. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. — 2009. — № 48 (1). — P. 11–22.
5. Flowers M. E., Inamoto Y., Carpenter P. A. et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria // Blood. — 2011. — № 117 (11). — P. 3214–3219.
6. Fujioka T., Taniguchi Y., Masuda T. et al. The effect on the proliferation and apoptosis of alloreactive T cells of cell dose in a murine MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation model // Transpl. Immunol. — 2003. — № 11 (2). — P. 187–195.
7. Jenq R. R., Taur Y., Devlin S. M. et al. Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2015. — № 21 (8). — P. 1373–1383.
8. Luznik L., Jalla S., Engstrom L. W. et al. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide // Blood. — 2001. — № 98 (12). — P. 3456–3464.
9. Luznik L., O'Donnell P. V., Fuchs E. J. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation // Semin. Oncol. — 2012. — № 39 (6). — P. 683–693.
10. Martin P. J., Rizzo J. D., Wingard J. R. et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2012. — № 18 (8). — P. 1150–1163.
11. Reddy P., Ferrara J. L. M. Mouse models of graft-versus-host disease // StemBook / eds. by The Stem Cell Research Community. — 2009. — 28 febr.
12. Ruutu T., Gratwohl A., de Witte T. et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice // Bone Marrow Transplant. — 2014. — № 49 (2). — P. 168–173.
13. Sale G., Shulman H., Hackman R. Pathology of hematopoietic cell transplantation // Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation / eds. by K. Blume, S. Forman, F. Appelbaum. — 3rd ed. — Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. — P. 286–299.
14. Schroeder M. A., DiPersio J. F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations // Dis. Model. Mech. — 2011. — № 4 (3). — P. 318–333.
15. Stokes J., Hoffman E. A., Zeng Y. et al. Post-transplant bendamustine reduces GvHD while preserving GvL in experimental haploidentical bone marrow transplantation // Br. J. Haematol. — 2016. — № 174 (1). — P. 102–116.
16. van der Velden W. J., Plantinga T. S., Donnelly J. P. et al. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing Candida in infection and inflammation // Virulence. — 2010. — № 1 (3). — P. 180–184.
17. Weber D., Oefner P. J., Dettmer K. et al. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant. — 2016. — № 51 (8). — P. 1087–1092.

РЕЗЮМЕ

И. С. Моисеев, Е. А. Бурмина, А. В. Ботина, М. О. Попова, А. Р. Муслимов, О. Г. Смыкова, К. В. Леник, К. В. Мельситова, А. И. Шакирова, И. М. Бархатов, В. В. Байков, О. В. Галибин

Постановка экспериментальной модели аллогенной трансплантации костного мозга и реакции «трансплантат против хозяина»

Экспериментальное моделирование аллогенной трансплантации костного мозга и реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) крайне важно для совершенствования технологии трансплантации и исследования новых иммуносупрессивных препаратов. В настоящем исследовании оценивали применимость кондиционирования бусульфаном и циклофосфаном с профилактикой посттрансплантационным циклофосфаном (150 мг/кг) на комбинациях линий мышей «донор-реципиент» C57Bl/6-Balb/c и Balb/c-C57Bl/6. Выявлено, что Balb/c-мыши, в отличие от C57Bl/6-мышей, не могут быть реципиентами из-за высокой летальности от острой токсичности химиопрепаратов. При гистологическом исследовании C57Bl/6-реципиентов острая РТПХ выявлена у 93% животных. У всех животных наблюдали РТПХ только 1–2-й степени тяжести. Данная модель является перспективной для исследований в области трансплантологии, однако требуется снижение интенсивности профилактики для усиления проявлений РТПХ.

Ключевые слова: трансплантация костного мозга, реакция «трансплантат против хозяина», РТПХ, бусульфан, циклофосфан, C57Bl/6, Balb/c.

SUMMARY

*I. S. Moiseev, E. A. Burmina, A. V. Botina,
M. O. Popova, A. R. Muslimov, O. G. Smykova,
K. V. Lepik, K. V. Melsitova, A. I. Shakirova,
I. M. Barkhatov, V. V. Baikov, O. V. Galibin*

Development of murine model of allogeneic bone marrow transplantation and graft-versus-host disease

Modeling of allogeneic bone marrow transplantation and graft-versus-host disease (GVHD) plays a crucial role in the improvement of transplantation procedures and testing novel immunosuppressive drugs. In this study we evaluated the feasibility of busulfan and cyclophosphamide conditioning with post-

transplantation cyclophosphamide (150 mg/kg) in donor-recipient pairs C57Bl/6-Balb/c and Balb/c-C57Bl/6. We observed that Balb/c mice as opposed to C57Bl/6 mice can't be the recipients because of the unacceptably high acute mortality from acute toxicity of chemotherapeutic drug. Histological studies in the C57Bl/6 recipients revealed acute GVHD in 93 % of animals. All animals had only grade I–II severity of GVHD. This model has the potential for future studies in the field of transplantology, nonetheless a decrease in the intensity of prophylaxis is required to augment the manifestations of GVHD.

Key words: bone marrow transplantation, graft-versus-host disease, GVHD, busulfan, cyclophosphamide, C57Bl/6, Balb/c.

© Коллектив авторов, 2016 г.
УДК 616-089.843 : 575

**И. М. Бархатов, А. И. Шакирова,
А. В. Евдокимов, О. Г. Смыкова,
Д. Е. Ершов, Л. С. Зубаровская,
Б. В. Афанасьев**

InDel-ПОЛИМОРФИЗМ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ПОСТ-ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ХИМЕРИЗМА

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) является радикальным методом лечения ряда онкологических и наследственных заболеваний, обеспечивающим частичную или полную замену популяции гемопоэтических клеток пациента. При этом имеет значение не только сам факт приживления клеток донора, но и кинетика данного процесса, что определяет необходимость разработки чувствительных и воспроизводимых методов исследования. Среди существующих подходов определения донорского химеризма (соотношение клеток донора и реципиента) можно отметить методы, связанные с оценкой выявляемых у реципиента групп крови, выполняемые с использованием стандартного набора антител системы АВ0 [4]. Однако данный подход, несмотря на свою простоту, не позволяет оценить точное соотношение клеток донора и реципиента, предполагает субъективную оценку результатов, а также не информативен в раннем посттрансплантационном периоде.

В ряде работ применялся метод с использованием проточной цитофлуорометрии, базирующийся на выявлении различных вариантов антигенов

главного комплекса гистосовместимости (HLA) [5, 12]. Внедрение данного подхода, несмотря на возможность анализа линейного химеризма (оценка в различных субпопуляциях) клеток донора и высокую чувствительность, не может быть рекомендовано при родственной трансплантации и предполагает, как правило, наличие несовместимости по комплексу HLA.

Также методы стандартного кариотипирования и *in situ*-гибридизации (FISH) информативны лишь при разнополой трансплантации [3] и уступают молекулярно-генетическим методам исследованиям в чувствительности. Наиболее перспективным в оценке донорского химеризма (ДХ) является применение, с одной стороны, высокополиморфных маркеров, а с другой – подходов, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью. В свою очередь, применение полимеразной цепной реакции позволило идентифицировать митохондриальную популяцию гемопоэтических клеток реципиента, способных к инициации развития рецидива заболевания. Так, в настоящее время активно используются подходы, базирующиеся на амплификации сателлитных последовательностей коротких тандемных повторов (short tandem repeats, STR, и variable number tandem repeats, VNTR). Эти маркеры представляют собой многократно повторяющиеся (от 4 до 50 раз) последовательности [9] в некодирующей последовательности ДНК, что обеспечивает их полиморфность. Оценка результатов проводится методом гелеэлектрофореза, с использованием как электрофореза в камере, так и капиллярного электрофореза, обеспечивающего лучшую дискрецию сигнала и более высокую чувствительность. В свою очередь, часть из используемых маркеров была рекомендована для идентификации личности [2], также были разработаны рекомендации по выбору маркеров и интерпретации результатов ДХ [10].

С другой стороны, при анализе сателлитных последовательностей на чувствительность метода ока-